
ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDES

SUR LE BACILLE D'EBERTH ET LES BACILLES PARATYPHIQUES

(PREMIER MÉMOIRE)

CARACTÈRES GÉNÉRAUX DE 70 ÉCHANTILLONS

par M. NICOLLE, M^{lle} A. RAPHAEL et E. DEBAINS.

Nous nous sommes proposé de reprendre, aussi complètement que possible, l'histoire des germes désignés sous les noms de bacille d'Eberth et bacilles paratyphiques, c'est-à-dire de bien connaître leurs diverses particularités et d'établir la signification respective de celles-ci au double point de vue théorique et pratique.

Lorsqu'on étudie une bactérie, il convient de diviser ses caractères en plusieurs groupes. Le meilleur mode de division, dicté du reste par les nécessités techniques, nous semble être le suivant.

1. *Caractères généraux.* — On appellera ainsi (faute de mieux) l'ensemble des caractères morphologiques, des caractères de culture et des caractères biologiques. Il est urgent de définir exactement ces propriétés, sous peine de rendre stérile toute recherche ultérieure. Malgré sa réputation d'aridité, l'examen des caractères généraux demeure plein d'intérêt

quand on s'attache à lui donner de plus en plus de précision et d'étendue.

2. *Caractères antigènes.* — Une bactérie constitue, selon nous, non seulement une « mosaïque » de propriétés, mais encore une « mosaïque » de substances particulières, que l'on dénomme substances antigènes (abrégativement : antigènes). Elles engendrent, par immunisation, des agglutinines (éventuellement, des précipitines) et des lysines, qui sont à leur égard des réactifs d'élection. Ce qui caractérise chaque microbe, c'est le mode de distribution des divers antigènes, avec dominance habituelle de l'un d'entre eux.

Beaucoup de méthodes d'identification sont basées sur des « réponses » antigènes : agglutination (éventuellement, précipitation) et lyse *in vitro* ; immunité et hypersensibilité *in vivo* ; lyse *in vivo*.

3. *Virulence.* — Rappelons sa seule définition acceptable : végétabilité *in vivo*. — L'étude de ses modalités s'impose et pour elle-même et comme base des réactions « anti », pratiquées chez l'animal.

4. *Fonction toxigène.* — Elle réside dans la sécrétion de poisons spécifiques, qui jouissent du pouvoir « anti », comme les substances dont il a été question plus haut ; comme, aussi, les enzymes, grâce auxquels les bactéries exercent leurs actions chimiques.

Les enzymes bactériens possèdent, semble-t-il, un trop faible caractère « anti » pour que l'on puisse discerner clairement, avec les méthodes actuelles, si des diastases, accomplissant le même travail chez des germes différents, conservent cependant leur spécificité distincte (comme cela est le cas avec le lab et la cynarase, substances beaucoup plus antigènes). Il y aurait lieu de reprendre la question, qui intéresse et la théorie et la pratique.

Nous réserverons, *conventionnellement*, le nom d'antigènes aux constituants spécifiques des microbes ; ailleurs, nous dirons : toxines ou enzymes (bien qu'il s'agisse encore d'antigènes, répétons-le).

Ces préliminaires établis, voici l'ordre que nous suivrons dans notre travail : *origine des échantillons étudiés ; caractères généraux du bacille d'Eberth et des bacilles paratyphiques ; d'après les auteurs ; technique employée par nous ; résultats de nos recherches ; conclusions.*

ORIGINE DES ÉCHANTILLONS ÉTUDIÉS

ORGANISME HUMAIN.

La plupart des germes proviennent d'hémocultures, pratiquées au cours d'affections fébriles de nature habituellement typhoïde.

Échantillons : 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 37, 48, 52, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 63, 66, 69, 70, 71, 97, 124, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136.

Un échantillon a été isolé de liquide céphalo-rachien : n° 36.

Un autre, de pus articulaire : n° 95.

Trois, de la rate, *post mortem* : n°s 38, 39 et 64.

Deux, de la bile, *post mortem* également : n°s 67 et 68.

ORGANISME ANIMAL.

Souris. — Infection septicémique : n°s 3 et 4.

Rat. — Virus Danysz : n° 80.

Cheval. — Épididymite : n° 115.

Perruche. — Psittacose (Nocard) : n° 19.

Mentionnons, enfin, l'échantillon Gärtner (n° 65), dont nous ignorons la provenance exacte.

Un certain nombre de germes ont été isolés par nous ; les autres sont dus à l'obligeance de MM. Legroux, Cotoni, Dumas, Armand-Delille, Sarrailhé, Clunet, Netter, Vallée, Hardouin, que nous ne saurions trop remercier. Nous remercions aussi notre ami Legroux de nous avoir fourni beaucoup de ces « petits » renseignements, qui rendent de si grands services.

CARACTÈRES GÉNÉRAUX DU BACILLE D'EBERTH

ET DES BACILLES PARATYPHIQUES, D'APRÈS LES AUTEURS

Nous nous contenterons de rappeler les points essentiels.

CARACTÈRES * MORPHOLOGIQUES.

Bacilles « gram-négatifs », asporulés et mobiles (habituellement, très mobiles). Ces propriétés étant communes aux trois groupes de microbes envisagés, ne peuvent qu'aider à les distinguer d'autres familles bactériennes.

CARACTÈRES DE CULTURE.

L'étude des cultures, véritable morphologie macroscopique, comporte avant tout l'examen suivi des développements en bouillon, sur (et en) gélatine et gélose, sur pomme de terre.

BOUILLON. — Trouble d'opacité variable, plus faible ordinairement dans le cas du bacille paratyphique A. — Voile rare avec le bacille typhique, inconstant avec le bacille paratyphique B (pour le bacille paratyphique A, les auteurs sont peu explicites).

GÉLATINE. — Les colonies profondes n'offrent rien de spécial; les superficielles revêtent, plus ou moins strictement, l'un des aspects suivants, communs aux trois groupes de microbes étudiés.

Type typhique. — Colonies minces, transparentes, finement dentelées, froncées à leur surface.

Type colibacillaire. — Colonies épaisses, assez opaques, grossièrement découpées, à facettes, surmontées d'un bouton.

Type hémisphérique. — Petite pastille porcelainée; surface lisse et bords nets. Apparence réalisée plus souvent par le bacille paratyphique B que par les deux autres groupes de germes, mais inconstante.

GÉLOSE. — (Colonies superficielles). Les types typhique et colibacillaire sont moins nets ici que sur gélatine; le type hémisphérique coexiste volontiers avec une consistance muqueuse, assez caractéristique du bacille paratyphique B.

POMME DE TERRE. — Tous les intermédiaires entre la « trainée de limace » du bacille d'Eberth et le dépôt abondant et brunâtre du colibacille.

Donc : point de critérium « culturel », permettant de distinguer nos trois types microbiens entre eux et même de les séparer d'autres bactéries (bacille de Shiga, bacille de Flexner, colibacille...).

CARACTÈRES BIOLOGIQUES.

Caractères négatifs, communs aux trois groupes étudiés.

Absence de protéolyse, de fermentation du lactose (et de coagulation du lait), de production d'indol. Ces caractères négatifs ont une *importance capitale*.

*Caractères, tantôt positifs tantôt négatifs,
suivant le groupe étudié.*

Réduction du rouge neutre, fermentation du glucose, production d'H²S, alcalinisation « de retour » en petit-lait tournesolé.

Bacille typhique. — Ne réduit pas le rouge neutre; ne fermente pas le glucose; produit H²S; rougit le petit-lait tournesolé et le laisse tel quel.

Bacille paratyphique A. — Réduit le rouge neutre; fermente le glucose; ne produit pas H²S; rougit le petit-lait tournesolé et le laisse tel quel.

Bacille paratyphique B. — Réduit le rouge neutre; fermente le glucose; produit H²S; rougit d'abord le petit-lait, puis le fait virer au bleu.

Sauf dans de rares travaux (Sarrahilhé et Clunet, notamment), on passe à peu près sous silence les échantillons irréguliers et leurs anomalies ne sont l'objet d'aucune discussion.

TECHNIQUE SUIVIE

Nous sommes toujours partis des colonies *isolées* et rigoureusement *pures*, au point de vue macroscopique et microscopique. Nos diverses souches ont été conservées en gélatine, à la glacière et rajeunies le moins souvent possible. Pour les besoins courants, on se contentait de cultures sur gélose-Martin gardées dans l'armoire.

Conservation des souches à la glacière. — Une partie de culture en bouillon Martin (24 heures — 37°) était additionnée de deux parties de gélatine au bouillon-Martin. Après mélange, on scellait le tube au chalumeau.

N'ayant rien observé de nouveau, dans le domaine des caractères morphologiques et des caractères de culture, nous n'envisagerons que les caractères biologiques et la technique correspondante. Celle-ci comprend la préparation des milieux suivants.

Liquide Fränkel. — Solution nutritive, utilisée jadis pour distinguer le bacille typhique du colibacille. Nous avons trouvé avantageux d'y recourir, pour l'étude comparée de nos trois groupes microbiens. Elle permet d'apprécier les exigences alimentaires des différents échantillons.

Gélose au sous-acétate de plomb. — Milieu classique, pour déceler la production d'H²S.

Gélose au rouge neutre. — Excellent milieu, pour mettre en évidence le pouvoir réducteur des microbes.

Comme la gélose au sous-acétate de plomb, la gélose au rouge neutre doit être répartie en culots et non pas inclinée. Il s'agit, ici et là, d'obtenir des « réactions anaérobies » par des « ensemencements profonds ».

Eau peptonée et glucosée. — La fermentation du sucre de raisin se manifeste nettement lorsque, sur le milieu que contient le tube à essai, on renverse une petite éprouvette, remplie du même liquide. Les bulles gazeuses y montent progressivement.

Eau peptonée et lactosée. — Dispositif identique. Ce milieu permet de distinguer nos trois types microbiens des divers ferments du lactose et avant tout du colibacille.

Petit-lait tournesolé. — Milieu classique, pour déceler les réactions du bacille paratyphique B.

Lait tournesolé. — Nous avons employé systématiquement ce liquide, qui permet de séparer nos trois groupes microbiens des bactéries lactiques et de mesurer leur pouvoir alcaligène respectif.

Eau peptonée. — Indispensable, pour différencier nos germes des microbes qui forment de l'indol, notamment du colibacille.

Voici, maintenant, dans ses détails, le mode de préparation des milieux qui viennent d'être indiqués.

LIQUIDE FRÄNKEL.

Chlorure de sodium	5 grammes.
Phosphate bipotassique	2 —
Asparagine	4 —
Lactate d'ammoniaque	6 —
Eau distillée	1.000 —

Alcaliniser légèrement (tournesol). Porter 15 minutes à 115°. Filtrer. Répartir. Porter 15 minutes à 110°.

On ensemence avec une goutte de culture en bouillon-Martin; les deux passages suivants se font également avec une goutte (on ne repique pas, naturellement, dans le cas de culture négative).

GÉLOSE AU SOUS-ACÉTATE DE PLOMB.

Viande de bœuf	500 grammes.
Eau distillée	1.000 —

Faire macérer 12 heures. Bouillir 15 minutes (petit feu). Laisser refroidir, écumer et filtrer sur Chardin. Ajouter 10 grammes de peptone Defresne. Titrer l'acidité, en prélevant 10 cent. cubes de liquide, puis ramener cette acidité au taux de 0 gr. 225 de SO^4H^2 par litre. Ajouter 5 grammes de gélose p. 1.000 cent. cubes. Porter 15 minutes à 118° . Filtrer. Répartir. Porter 15 minutes à 112° . Lors de l'emploi, ajouter, pour chaque tube, contenant 6-8 cent. cubes de gélose, 0 c.c. 1 d'une solution au 10° , dans l'eau distillée, de sous-acétate de plomb liquide du Codex (le réactif plombique sera stérilisé immédiatement avant l'emploi).

[*Titrage de l'acidité, etc....* — On prélève, avons-nous vu, 10 cent. cubes de liquide. On ajoute 2 gouttes de phtaléine (alcoolique : 1/30) et on verse une solution de soude décimale jusqu'à coloration rosée faible. Supposons qu'il ait fallu verser 2 c.c. 2. On ajoutera 2 c.c. 2—0 c.c. 5 par 10 cent. cubes, soit 17 cent. cubes de soude normale pour 1 litre de milieu (0 c.c. 5 de soude décimale par 10 cent. cubes correspond à 0 gr. 225 de SO^4H^2 pour un litre)].

On ensemece largement, en partant d'une culture sur gélose-Martin inclinée. Le fil de platine chargé doit être introduit entre la paroi du tube et le milieu au plomb; il sera dirigé de manière à faire un trait net.

GÉLOSE AU ROUGE NEUTRE.

Se prépare, en gros, comme la gélose au plomb, mais avec les différences suivantes.

1^o Pour la réaction, soustraire 1,5 au lieu de 0,5 par 10 cent. cubes de milieu.

2^o Après filtration de la gélose, ajouter, dans le filtrat provenant d'un litre, 5 cent. cubes de la solution suivante :

Rouge neutre	0 c.c. 1
Eau distillée.	20 cent. cubes.

Puis, répartir et stériliser 15 minutes à 112° .

On ensemece largement, par piqure centrale, en partant d'une culture sur gélose-Martin inclinée.

EAU PEPTONÉE ET SUCRÉE.

Peptone Defresne	25 grammes.
Glucose ou lactose.	10 —
Soude normale.	20 cent. cubes.
Eau distillée.	1.000 —

Verser environ 4 cent. cubes par tube à essai. Remplir totalement des *petits tubes* (faisant fonction d'éprouvettes), les retourner et les introduire dans les grands. Porter 15 minutes à 110° .

On ensemece au fil de platine, en partant d'une culture sur gélose-Martin.

PETIT-LAIT TOURNESOLÉ.

Ecrémer le lait. Porter à 40°. Ajouter un excès de présure en pastilles (par exemple, pour 1.000 cent. cubes, le 6^e d'une pastille). Laisser coaguler, pendant 1-2 heures, après avoir éteint. Fendre le caillot (gros morceaux). Jeter sur linge fin. Alcaliniser le filtrat avec de la soude, jusqu'au rouge franc de la phtaléine. Ajouter 2 grammes de CaCl_2 cristallisé par litre. Porter 15 minutes à 110°. Filtrer sur papier, jusqu'à ce que le liquide passe clair. Vérifier que la réaction est bonne (*violet foncé au tournesol*). Ajouter une solution aqueuse de tournesol (2 p. 100) jusqu'à ce que la teinte soit assez nourrie (prélever, de temps en temps, un peu de liquide, le verser dans un tube à essai et bien examiner sa nuance). Filtrer sur bougie. Répartir. Eprouver (étuve deux jours, puis température ordinaire 8 jours). Capuchonner.

On ensemece avec une goutte de culture en bouillon-Martin.

LAIT TOURNESOLÉ.

Prendre du lait *très frais et non écrémé*. Le répartir par 8 cent. cubes environ. Stériliser 15 minutes à 110°, en ayant soin de ne pas trop tasser les tubes. Au moment de l'emploi, ajouter la teinture aqueuse de tournesol à 2 p. 100 (6-8 gouttes dans chaque tube).

On ensemece avec une goutte de culture en bouillon-Martin.

EAU PEPTONÉE. ¶

Peptone Defresne	25 grammes.
Soude normale.	20 cent. cubes.
Eau distillée	1.000 —

Verser environ 4 cent. cubes par tube. Porter 15 minutes à 110°.

On ensemece avec une goutte de culture en bouillon-Martin.

RÉSULTATS DE NOS RECHERCHES

Nous étudierons d'abord les aspects divers fournis par nos échantillons, dans les milieux dont la préparation vient d'être indiquée. Puis, nous montrerons la façon suivant laquelle ces aspects se groupent, selon que l'on est en présence du bacille d'Eberth, du bacille paratyphique A ou du bacille paratyphique B *typiques*. Enfin, nous examinerons une série de germes que leurs caractères anormaux ne permettent pas de classer parmi les trois formes « canoniques ».

ASPECTS FOURNIS PAR NOS ÉCHANTILLONS.

Liquide Fränkel.

Culture toujours positive dans le premier tube; inconstante, dans le second; toujours positive dans le troisième, lorsqu'elle l'a été dans le second

(ce troisième tube devient donc, désormais, inutile). Abondance très variable; voile exceptionnel.

En résumé: possibilité ou impossibilité d'obtenir un développement dans le second tube de milieu Fränkel: voilà le fait essentiel.

Gélose au sous-acétate de plomb.

Résultats, après 24 heures. — Quatre éventualités: 1° trait blanc (dépôt microbien), au niveau de la strie d'ensemencement; 2° petite ligne grisâtre; 3° ligne noire, 3-4 fois plus large que la strie d'ensemencement et tranchant sur la couleur, non modifiée, du milieu; 4° ligne noire et teinte gris brun (plus ou moins foncée) du milieu.

Résultats, passé 24 heures. — 1°: petite ligne grise; 2°: ligne grise nette; 3° et 4°: pas de changement.

Donc: formation d'H²S tantôt nulle (ou pratiquement nulle) après 24 heures, tantôt marquée (voire très marquée).

Gélose au rouge neutre.

Résultats, après 48 heures. — Deux éventualités. 1° Le milieu garde sa couleur. Toutefois, dans le cas de culture superficielle abondante, la gélose sur laquelle repose immédiatement le dépôt microbien prend éventuellement une teinte orangée sans fluorescence (ce qui ne comporte aucun sens diagnostique). 2° Virage et fluorescence du milieu (jaune par transparence, verdâtre par réflexion). Le virage débute au fond du tube et s'étend vers la surface, qu'il n'atteint point d'ordinaire. Le phénomène peut, d'ailleurs, être complet (extension à tout le culot, en 24-48 heures) ou incomplet (parfois limité au fond du tube).

Résultats, après plus de 48 heures. — 1° Le milieu continue à garder sa teinte initiale. 2° Etat stationnaire. Quand on emploie la gélose *glucosée* au rouge neutre, celle-ci se recolore de haut en bas. Le glucose, en fermentant, produit des acides, qui favorisent l'oxydation du leuco-dérivé formé. [Pareillement, lorsqu'on réduit, par l'hydrosulfite de soude, le rouge neutre additionné d'acide lactique, il se recolore plus vite que si on l'avait additionné d'alcali.]

Donc: virage et fluorescence, présents ou absents.

Eau peptonée et glucosée.

[Examen quotidien, pendant 5 jours.]

Deux éventualités. 1° Pas de dégagement gazeux. 2° Dégagement gazeux. Presque toujours net après 24 heures et terminé après 3-4 jours. Intensité variable: tantôt limité à la concavité de l'éprouvette, tantôt étendu soit au tiers, soit à la moitié de celle-ci.

Donc: fermentation ou non.

Eau peptonée et lactosée.*Jamais de fermentation.***Petit-lait tournesolé.***[Examen quotidien, pendant 3 jours.]*

Couleur du milieu. — Trois éventualités. 1^o Acidification légère, puis retour à la teinte sensible (exceptionnellement, réduction). 2^o Acidification légère persistante (parfois tout s'arrête à la teinte sensible). 3^o Virage au bleu, incomplètement précédé d'acidification, inconstamment suivi de réduction. Dans quelques cas, acidification légère, immédiatement suivie de réduction (décoloration), laquelle masque le virage au bleu.

Formation d'un voile bleu. — Trois éventualités. 1^o Cette formation n'a pas lieu. 2^o Elle est précoce (24-48 heures). 3^o Elle est tardive (3^e jour — si l'on conservait les cultures plus longtemps, on verrait que le voile peut même n'apparaître que du 5^e au 8^e jour).

Donc : acidification, soit persistante soit transitoire; dans ce dernier cas, retour à la teinte sensible ou formation d'un voile bleu.

Lait tournesolé.*[Examen quotidien, pendant 20 jours.]*

Couleur du milieu. — Deux éventualités. 1^o Acidification légère, avec ou sans retour à la teinte sensible. 2^o Acidification très légère, avec alcalinisation consécutive, généralement précédée d'une phase de réduction, au cours de laquelle le lait prend le ton du vieil ivoire. L'alcalinisation peut être très prononcée; on voit alors le milieu passer progressivement du bleu de lin au bleu de cobalt et arriver, entre le 15^e et le 20^e jour, au bleu d'outremer.

Bleuissement de la surface. — Deux éventualités. 1^o Le phénomène n'a pas lieu. 2^o Il apparaît dès le lendemain de l'ensemencement (et ne s'observe d'ailleurs qu'avec le lait non écrémé). On voit la surface de la crème prendre une couleur bleue intense, qui s'étend quelquefois à la partie supérieure du milieu, dont le reste demeure encore légèrement acide. Le bleuissement persiste plusieurs jours et peut se combiner aux diverses nuances du liquide (lilas, bleu de lin, ivoire).

Coagulation. — *Toujours absente.*

Donc : acidification, soit persistante soit transitoire; dans ce dernier cas, simple retour à la teinte sensible ou alcalinisation consécutive — bleuissement de la surface ou absence de bleuissement.

Eau peptonée.

Recherche de l'indol, après 2 et 8 jours, par les méthodes de Salkowski ou d'Ehrlich (voir, pour la technique, E. Debains : « Sur les bacilles du groupe Flexner-Y. » Ces *Annales*, février 1917).

Il n'apparaît jamais d'indol.

CARACTÈRES DES TYPES NORMAUX.

(*Bacille d'Eberth, bacille paratyphique A,*
bacille paratyphique B.)

Nous sommes d'accord avec les auteurs, en ce qui concerne les *caractères négatifs* communs aux trois types normaux (absence de fermentation du lactose et de coagulation du lait; absence de production d'indol) et les *caractères, tantôt positifs, tantôt négatifs*, selon le type envisagé. On a vu, pour ces derniers, que nous nous étions efforcés de les analyser de très près et de les compléter (étude systématique des cultures dans le lait et emploi du liquide Fränkel, notamment).

Le *tableau* ci-joint résume les particularités essentielles du bacille d'Eberth et des bacilles paratyphiques « légitimes ».

Un mot, concernant l'*abondance respective des trois types microbiens*, cultivés sur des surfaces égales et dans des conditions identiques.

Si l'on prend, comme unité, le bacille paratyphique A (moyenne de tous les échantillons), le bacille typhique (moyenne) montre la valeur 1,16 et le bacille paratyphique B (moyenne) la valeur 1,41 (2,75 pour le colibacille — moyenne de nombreux spécimens typiques).

Il est bon de connaître ces différences moyennes (et les différences individuelles), non seulement au point de vue théorique, mais encore pour l'obtention de masses notables de germes (immunisation, réactions antigènes *in vitro*...).

Rappelons aussi l'*odeur*, fétide et tenace, qui semble propre aux cultures *du bacille paratyphique B*, mais qui peut faire défaut.

CARACTÈRES DES ÉCHANTILLONS ANORMAUX.

Ils se répartissent en 8 groupes. Pour chacun d'eux, nous indiquerons d'abord sa *nature apparente*, c'est-à-dire la place qu'il occuperait si on voulait le faire rentrer « de force » dans un des types « canoniques » — puis, nous discuterons sa *nature réelle*, tantôt plus ou moins probable tantôt simplement possible, selon les cas.

LIQUIDE FRÄNKEL	GÉLOSE AU SOUS-ACÉTATE DE PLOMB	GÉLOSE AU ROUGE NEUTRE	EAU PEPTONÉ ET GLUCOSÉE	PETIT-LAIT TOURNESOLÉ	LAIT TOURNESOLÉ
Bacilles typhiques. [Nos: 2, 9, 10, 41, 42, 43, 46, 47, 48, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 48, 58, 64, 63, 68.]	Strie noire. Milieu non modifié en général.	Pas de virage. Pas de fluorescence.	Pas de gaz.	Acidification légère, puis retour à la teinte sensible. Pas de voile. (Dans un seul cas, n° 41, réduction.)	Acidification légère, puis retour à la teinte sensible. Pas de bleuissement de la surface.
Bacilles paratyphiques A. [Nos: 22, 23, 56, 59, 66, 67, 69, 70, 71.]	Strie blanche ou strie grise étroite, après 24 heures. Donc: production d'H ₂ S nulle ou pratiquement nulle.	Virage et fluorescence constants, mais réaction souvent incomplète après 48 heures.	Gaz.	Acidification légère, persistante ou suivie d'un retour à la teinte sensible. Parfois, tout s'arrête rapidement à cette teinte. Pas de voile.	Acidification légère, s'écartant peu de la teinte sensible. Pas de bleuissement de la surface.
Bacilles paratyphiques B. [Nos: 4, 3, 4, 8, 14, 15, 49, 25, 26, 34, 32, 57, 60, 64, 65, 80.]	Strie noire intense. Généralement diffusion dans le milieu.	Virage et fluorescence constants; d'ordinaire complets après 48 heures.	Gaz.	Virage au bleu, instantané, inconstamment suivi de réduction. Parfois, acidification légère, immédiate-ment suivie de réduction. Voile bleu, après 24-48 heures.	Acidification légère peu durable; puis, virage au bleu de plus en plus intense. Ce virage est précédé, dans la majorité des cas, d'une phase de réduction (décoloration du milieu). Bleuissement de la surface.

Rappelons qu'on ne se place, ici, qu'au seul point de vue des caractères généraux (et, spécialement, des caractères biologiques).

Groupe 1.

(Échantillons 39 et 97.)

Nature apparente. — Bacilles typhiques ne produisant pas d'H²S.

Nature réelle. — Indéterminée. Il peut s'agir de bacilles d'Eberth, ayant perdu la propriété en question; laquelle constitue, malheureusement, l'unique caractère biologique positif de l'organisme typhique. Il peut s'agir aussi de germes ne l'ayant jamais possédée et dont la place, dans le monde des bactéries, ne saurait être fixée que par la connaissance approfondie de leurs autres particularités.

Il serait indiqué de rechercher si, soit spontanément (et d'une façon inopinée), soit par des cultures suivies au sein de milieux favorables (c'est-à-dire contenant du soufre ou riches en peptone), le caractère absent est susceptible de reparaitre. On pourrait, également, par des isollements successifs, tenter de rencontrer quelques rares individus capables d'avoir éventuellement conservé la faculté abolie chez la masse des autres.

Groupe 2.

(Échantillons 52 et 124.)

Nature apparente. — Bacilles typhiques formant un voile dans le petit-lait.

Nature réelle. — Il n'est pas exceptionnel de voir le bacille d'Eberth former un voile *tardif* (après 3 jours) dans le petit-lait. L'anomalie, observée ici, ne portant que sur la précocité de cette formation, nous estimons difficile de ne pas considérer les deux échantillons indiqués comme de véritables organismes typhiques.

Groupe 3.

(Échantillon 6.)

Nature apparente. — Bacille typhique formant un voile dans le petit-lait, bleuissant le lait et faisant des passages en liquide Fränkel.

Nature réelle. — Cet échantillon offre vraiment trop de caractères surajoutés pour qu'on puisse l'identifier avec le bacille d'Eberth, tel que nous l'avons défini. L'étude de ses autres caractères peut seule permettre de lui assigner une place exacte.

Groupe 4.

(Échantillons 7 et 115.)

Nature apparente. — Bacilles paratyphiques A bleuisant le lait et faisant des passages en liquide Fränkel.

Nature réelle. — Mêmes réflexions que pour le groupe 3.

Groupe 5.

(Échantillons 126 136.)

Nature apparente. — Bacilles paratyphiques A produisant H^2S .

Nature réelle. — Par la production d' H^2S , ces échantillons s'éloignent beaucoup des bacilles paratyphiques A légitimes; malgré la production d' H^2S , on ne saurait penser à les classer parmi les bacilles d'Eberth ou les paratyphiques B. Donc, ils constituent un type spécial, que ses seuls caractères biologiques sont incapables à définir.

Nos amis, Sarrailhé et Clunet (1), auxquels nous devons ces curieux échantillons, en avaient d'ailleurs très bien apprécié la physionomie particulière.

Groupe 6.

(Échantillon 95.)

Nature apparente. — Bacille paratyphique B ne produisant pas d' H^2S .

Nature réelle. — Le cas de ce germe diffère de celui des représentants du groupe 1 en ce que la production d' H^2S ne constitue pas le seul caractère positif du bacille paratyphique B. Nous jugeons donc assez probable que cet échan-

(1) Victime de son dévouement, notre ami Clunet vient d'être emporté, à Jassy, par le typhus exanthématique. Nous ne saurions dire combien sa disparition nous afflige.

tillon ait été un bacille paratyphique B légitime et qu'il puisse le redevenir éventuellement.

Groupe 7.

(Échantillons 24, 33 et 34.)

Nature apparente. — Bacilles paratyphiques B bleuisant le lait sans y former de voile et ne faisant point de passages en liquide Fränkel.

Nature réelle. — On est porté à admettre que ces germes ont été des bacilles paratyphiques B authentiques et sont susceptibles de l'être encore un jour. *Mais il faudrait le démontrer.*

Groupe 8.

(Échantillons 27, 28 et 29.)

Nature apparente. — Bacilles paratyphiques B ne bleuisant pas le lait, n'y formant pas de voile et ne faisant point de passages en liquide Fränkel.

Nature réelle. — Mêmes réflexions que pour le groupe précédent.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Parmi les organismes que nous avons étudiés dans ce premier mémoire, *au point de vue exclusif de leurs caractères généraux*, un certain nombre doivent être considérés, sans hésitation, comme des bacilles typhiques ou des bacilles paratyphiques; la nature exacte des autres reste soit indéterminée, soit discutable. Elle deviendrait moins problématique si l'on pouvait répondre, dès maintenant, à la question suivante : les bacilles typhique et paratyphiques représentent-ils des variétés d'une seule espèce ou des espèces différentes?

L'étude isolée des caractères généraux ne permet pas de résoudre le problème. Il est d'ailleurs rare, dans le monde des bactéries, que l'on rencontre, parmi les seuls caractères généraux, soit un élément spécifique en lui-même, soit plusieurs propriétés peu communes, dont la réunion impose l'idée d'espèce.

ÉTUDES SUR LE BACILLE D'EBERTH ET LES BACILLES PARATYPHIQUES

(DEUXIÈME MÉMOIRE)

AGGLUTINATION DE 54 ÉCHANTILLONS EN PRÉSENCE DE 54 SÉRUMS DE LAPINS IMMUNISÉS

par M. NICOLLE, E. DEBAINS et M^{lle} A. RAPHAEL.

Dans le mémoire précédent, nous avons examiné tout ce qui concerne les « caractères généraux » du bacille d'Eberth et des bacilles paratyphiques. Le travail actuel ne représente, lui, qu'une partie de nos recherches sur les « caractères antigènes » de ces microbes.

On s'est proposé, ici, de connaître le pouvoir agglutinogène et l'agglutinabilité (directs et croisés) de 54 échantillons, en choisissant le lapin comme animal fournisseur d'anticorps. Parmi les 54 échantillons, 43 sont absolument typiques, quant aux caractères généraux; ils se décomposent ainsi : 20 bacilles d'Eberth (en abrégé, bacilles τ ou simplement τ), 9 bacilles paratyphiques A (bacilles α ou α) et 16 bacilles paratyphiques B (bacilles β ou β) — les autres montrent certaines anomalies déjà signalées et seront envisagés séparément (bien que figurant dans le tableau comme τ , α ou β , pour ne pas compliquer celui-ci).

L'« analyse antigène » des microbes qui font l'objet de nos travaux forme le pendant de leur « analyse biologique », abordée précédemment. Elle nécessite l'emploi de deux méthodes successives.

Tout d'abord, afin de discerner les « gros faits », il faut préparer et étudier un nombre assez considérable de sérums

agglutinants (l'agglutination représentant le premier phénomène à utiliser en analyse antigène). Le lapin se trouve alors indiqué et une immunisation rapide fournit des sérums suffisamment actifs pour les constatations d'ensemble. Certains de ces sérums, offrant des caractères de spécificité parfaite ou d'absence totale de spécificité, « signalent », *ipso facto*, les germes correspondants, qui seront préférés lors de l'immunisation des chevaux.

La seconde méthode repose sur l'emploi d'agglutinines puissantes, fournies par les chevaux fortement immunisés. Ces agglutinines constituent les réactifs les plus précieux de l'analyse antigène, comme on le verra dans le mémoire suivant.

Nous étudierons, successivement : l'*immunisation des lapins*, la *préparation des suspensions microbiennes* (etc...), les *résultats* de nos expériences (*échantillons normaux*), les *résultats* de nos expériences (*échantillons anormaux*) — et nous formulerons, en terminant, quelques *conclusions générales*.

[Tous les germes mentionnés ici figurent dans notre travail initial.]

IMMUNISATION DES LAPINS

On s'est servi, exclusivement, de *microbes tués à l'alcool-éther et détoxiqués à la pipéridine*.

On ensemaitait, habituellement, pour chaque type, 10 boîtes de Roux contenant de la gélose-pomme de terre (*Ces Annales*, juillet 1909).

Après 24 heures (37°) : émulsion des dépôts microbiens en eau physiologique, mélange et turbinage énergique (centrifuge de Jouan). On traitait ensuite les culots par un grand excès d'alcool-éther (aa) et, le lendemain, on les desséchait, vers 40°, dans l'appareil à air chaud de Jouan. Le poids de substance bacillaire, ainsi obtenue, diffère beaucoup selon la nature du microbe envisagé et, pour un même type, selon l'individu choisi.

Comme fournisseurs de sérums, nous nous sommes adressés à des *lapins vigoureux, de 2.500 grammes environ*. Chaque sujet recevait deux fois, en pleins muscles gastrocnémiens, 0,1 gr. de « germes alcool-éther » détoxiqués. Un intervalle de 7 jours séparait les injections; on saignait le sujet 7 jours après la seconde.

La dose de 0,1 gramme, reconnue par nous la meilleure,

nécessite (sous peine de tuer les animaux) une détoxication variable, pratiquement réduite à l'un des deux types suivants :

Détoxication faible (conventionnellement : type α). — On émulsionne 0,1 gr. de « germes alcool-éther » secs avec 1 cent. cube d'eau physiologique ; on ajoute 1 cent. cube de pipéridine au 1/50^e ; on mêle intimement et on plonge, pendant 5 minutes, dans l'eau bouillante.

Détoxication forte (conventionnellement ; type β). — Même technique, en utilisant ici la pipéridine au 1/25^e.

Le traitement par la pipéridine (inspiré des anciennes recherches de l'un de nous et de Frouin) altère, sans conteste, les propriétés antigènes, mais infiniment moins que la toxicité. Toutes les fois que nous l'avons pu, nous nous sommes bornés, naturellement, au type α pour les deux injections ; ailleurs, on a dû adopter les combinaisons $\alpha\beta$ (ou $\beta\alpha$) et même $\beta\beta$. La comparabilité des recherches se ressent peu de ces variantes, comme le prouve l'existence de très bons sérums, chez les sujets soumis au traitement $\beta\beta$ et de très mauvais, chez ceux qui ont reçu deux fois le mélange α .

On nous fera observer, selon toute vraisemblance, que, vis-à-vis du même germe, divers lapins, pris « dans le tas », doivent réagir diversement et qu'en utilisant un seul lapin par germe nous pratiquons systématiquement le sophisme *ab uno disce omnes*. Nous répondrons que, dans les expériences assez nombreuses où plusieurs lapins ont été traités de façon identique, leurs sérums se sont montrés pratiquement équivalents.

PRÉPARATION DES ÉMULSIONS MICROBIENNES

Les germes, cultivés sur gélose-pomme de terre (sans eau de condensation), en partant d'une semence jeune sur gélose-Martin, étaient suspendus, après 24 heures d'étuve, dans l'eau physiologique, à raison d'un centigramme de corps bacillaires par 20 cent. cubes de solution saline (NaCl 1 p. 100).

TECHNIQUE DE L'AGGLUTINATION

On ajoutait, pour 1 cent. cube d'émulsion : 1/100 (*limite inférieure, que nous avons cru devoir adopter*), 1/200, 1/500, 1/1.000, 1/2.000... de cent. cube de sérum (soit : 10^{-2} , $0,5.10^{-2}$).

Seuino antiparalytiques B. S. antiparalytiques

Bacilles Typhiques

B. Paratyphiques A

Bacilles

Paratyphiques B

[illegible]



2.10^{-3} , 10^{-3} , $0,5.10^{-3}$... cent. cube). Après mélange intime, les tubes, fermés au coton, demeuraient sur la table du laboratoire pendant 24 heures; la lecture se faisait ensuite à l'œil nu (aidé de la loupe).

NOTATIONS EMPLOYÉES

DANS LE TABLEAU QUI RÉSUME LES EXPÉRIENCES

Il nous a paru avantageux de remplacer les chiffres (sauf le signe 0) par des lettres, d'une lecture bien plus facile. Voici le sens de ces lettres :

- (0 = agglutination nulle avec 10^{-2} cent. cube de sérum).
- a = agglutination incomplète (mais très nette) avec 10^{-2} cent. cube de sérum.
- A = agglutination complète avec 10^{-2} , habituellement incomplète (rarement nulle) avec $0,5.10^{-2}$.
- B = agglutination complète avec $0,5.10^{-2}$, habituellement incomplète (rarement nulle) avec 2.10^{-3} .
- C = agglutination complète avec 2.10^{-3} , habituellement incomplète (rarement nulle) avec 10^{-3} .
- D = agglutination complète avec 10^{-3} , habituellement incomplète (rarement nulle) avec $0,5.10^{-3}$.

Toutefois, nous ne ferons pas état des titres agglutinatifs observés, à cause de la faiblesse relative de nos sérums.

[*Aucun des germes n'est influencé (même incomplètement) par le sérum de lapin normal, dilué à 10^{-2} .*]

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES (ÉCHANTILLONS NORMAUX)

Quand on embrasse, d'un coup d'œil, le *tableau* qui résume nos expériences, on s'étonne de ne pas y rencontrer, sur « fond de zéros », trois « carrés » remplis de lettres et bien délimités (suffisamment bien délimités, tout au moins) — « carrés » symbolisant l'interaction des trois groupes de sérums et des trois groupes d'échantillons.

Si, maintenant, on vient à examiner, parallèlement, le pouvoir agglutinant de chaque sérum (rangée horizontale) et l'ag-

glutinabilité de l'échantillon correspondant (rangée verticale), on s'aperçoit que les deux propriétés n'offrent généralement aucun rapport, pour l'ensemble du tableau. Pour les trois « carrés », arbitrairement délimités, il y a réciprocité fréquente (rien de plus) dans le domaine des τ et des α , moins fréquente dans le domaine des β .

Avant d'expliquer ces faits, d'apparence anormale, il convient d'étudier, successivement, le pouvoir agglutinant des divers sérums et l'agglutinabilité des divers microbes.

[Les sérums antityphiques, antiparatyphiques A et antiparatyphiques B seront ainsi désignés : sérums T, sérums A, sérums B; ou même : T, A, B.]

POUVOIR AGGLUTINANT DES SÉRUMS.

[En ce qui concerne le pouvoir agglutinant des sérums et l'agglutinabilité des germes, négliger, pour le moment, les échantillons (anormaux) : 39; 6; 7; 24, 33, 34; 27, 28, 29.]

Sérums T.

Action sur les bacilles τ . — Plus de la moitié des sérums agglutine tous les τ , le reste, sauf 1, presque tous.

Action sur les bacilles α . — Un quart des sérums agglutine la majorité des α ; avec le reste, on descend du tiers des échantillons à 0 (1 sérum).

Action sur les bacilles β . — La grande majorité des sérums n'agglutine qu'une minorité des β ; 2 sérums n'agglutinent point.

Donc : résultats « logiques » pour les τ , variables pour les α , inhabituels pour les β . Dans la règle, les sérums ne se montrent pas spécifiques. Les seuls auxquels on puisse donner cette épithète sont : le n° 48, qui agglutine tous les τ , un α et aucun β — le n° 35, qui agglutine tous les τ , deux β et aucun α . Parmi les moins spécifiques citons : les n°s 34 et 58, du type T + A (action très étendue sur les α et négligeable sur les β) — et les n°s 11 et 13, du type T + A + B (action très étendue sur les α et les β).

Sérums A.

Action sur les bacilles τ . — La majorité des sérums agglutine la majorité des τ ; avec le reste, on tombe de 4 échantillons à 0 (2 sérums).

Action sur les bacilles α . — La majorité des sérums agglutine tous les α ; 2 sérums, presque tous; 2, ~~1~~ majorité.

Action sur les bacilles β . — La grande majorité n'agglutine que de rares β ; 3 sérums n'en agglutinent aucun.

Donc : résultats « logiques » pour les α , variables pour les τ , inhabituels pour les β . Le seul sérum spécifique est le n° 66, qui agglutine tous les α et n'agit ni sur les τ ni sur les β . On peut citer, comme très voisin, le n° 22, qui agglutine tous les α , un seul τ et aucun β . Les autres n'offrent pas d'électivité, notamment les n°s 67, 59 et 70, du type A + T (action très étendue sur les τ et négligeable sur les β).

Sérums B.

Action sur les bacilles τ . — Plus de la moitié des sérums agglutine la grande majorité des τ (2 fois la totalité); avec la minorité, on descend de la moitié des échantillons à 1 (1 sérum).

Action sur les bacilles α . — Plus de la moitié des sérums agglutine la majorité des α ($\frac{1}{2}$ fois, la totalité); on tombe ensuite jusqu'à 0 (2 sérums).

Action sur les bacilles β . — Moins d'un tiers agglutine la grande majorité des β (2 fois la totalité); plus de la moitié agglutine plus de la moitié des β ; on descend ensuite jusqu'à 1 seul échantillon (1 sérum).

Donc : résultats peu satisfaisants pour les β ; « trop satisfaisants » pour les τ et les α . Le sérum le moins mauvais au point de vue de la spécificité est le n° 64, qui agglutine 13 β , un seul τ et aucun α . Le sérum le moins électif (*parmi nos 45*) est le n° 9, qui agglutine tous les échantillons, sauf un β . Entre les sérums 64 et 19 se placent les sérums du type B + T (action étendue sur les τ , négligeable sur les α), comme le n° 1; et du type B + T + A (action très étendue sur les τ et les α), comme le n° 8. Enfin, on rencontre des *sérums de nature paradoxale* : type T, représenté par les n°s 4 et 26, notamment; type A, représenté, en particulier, par le n° 65; type T + A (action très étendue sur les τ et les α , négligeable sur les β), comme le n° 57.

AGGLUTINABILITÉ DES GERMES.

Échantillons τ .

Action des sérums T. — La moitié des τ sont agglutinés par tous les sérums T; l'autre moitié par la presque totalité ou la grande majorité.

Action des sérums A. — Plus de la moitié des τ est agglutinée par plus de

la moitié des sérums A; on descend ensuite jusqu'à l'agglutination par 1 seul sérum.

Action des sérums B. — La grande majorité est agglutinée par plus de la moitié des sérums B; on tombe ensuite jusqu'à l'agglutination par 3 sérums.

Donc : résultats « logiques », avec les sérums T; variables, avec les sérums A et B. Absence de spécificité. Le « moins mauvais » échantillon est le n° 9, agglutiné par tous les sérums T, deux sérums A et 3 sérums B. Le « plus mauvais », le n° 68, agglutiné par tous les sérums T, 7 sérums A et 15 sérums B. La majorité des τ appartient aux types $\tau + \alpha$ (agglutination par plus de la moitié des sérums A), $\tau + \beta$ (agglutination par la majorité des sérums B et la minorité des sérums A), $\tau + \alpha + \beta$ (agglutination par la majorité des sérums B et plus de la moitié des sérums A).

Échantillons α .

Action des sérums T. — Un seul α est agglutiné par la grande majorité des sérums T; le reste, par la minorité (limite : agglutination par 1 seul sérum).

Action des sérums A. — Plus de la moitié des α est agglutinée par tous les sérums A; le reste, par la majorité.

Action des sérums B. — La grande majorité est agglutinée par plus de la moitié des sérums B; le reste, par 6 seulement.

Donc : résultats « logiques », avec les sérums A; inhabituels, avec les sérums T; variables, avec les sérums B. Le « moins mauvais » échantillon est le n° 56, agglutiné par 7 sérums A, 1 sérum T et 6 sérums B. Le « plus mauvais », le n° 23, agglutiné par tous les sérums A, 18 sérums T et 14 sérums B. La majorité des α appartient aux types $\alpha + \beta$ (agglutination par nombre de sérums B et peu de sérums T) et $\alpha + \beta + \tau$ (agglutination par nombre de sérums B et plus ou moins de sérums T).

Échantillons β .

Action des sérums T. — 3 échantillons sont agglutinés par plus de la moitié des sérums T; le reste, par un nombre qui décroît jusqu'à 0.

Action des sérums A. — Pas d'agglutination dans la majorité des cas (1 échantillon est agglutiné par la majorité des sérums A; 2, par la minorité).

Action des sérums B. — La majorité des échantillons est agglutinée par la moitié des sérums B; le reste, par un nombre décroissant (minimum : 6).

Donc : résultats variables avec les sérums B; inhabituels, avec les sérums T; exceptionnels, avec les sérums A. Pas d'échantillons susceptibles d'être dénommés les « moins mauvais » ou les « plus mauvais ». On rencontre des germes du type $\beta + \tau$ (agglutination par nombre de sérums T et par aucun sérum A) et un seul exemplaire du type $\beta + \alpha$ (agglutination par nombre de sérums A et peu de sérums T). Citons encore le *type paradoxal* $\tau + \beta$ (agglutination par la minorité des sérums B et peu ou pas de sérums A).

CONCLUSIONS.

Pour comprendre le sens des résultats, d'apparence anormale, qui viennent d'être obtenus en analysant notre tableau, il est indispensable de se représenter la genèse et le mode d'action des anticorps (ici, les agglutinines). Les travaux des auteurs et les nôtres permettent de résumer la question comme il suit.

Genèse et mode d'action des anticorps.

Ils relèvent de causes complexes, que l'on ne peut dissocier sans comparer entre elles de très nombreuses expériences, instituées dans des directions très variées.

Formation des anticorps.

Elle dépend de l'antigène (ici, le microbe), de l'animal et de la façon dont cet animal a été traité.

Facteur microbe. — Il faut considérer sa nature, c'est-à-dire la quantité respective des divers *antigènes élémentaires* qu'il contient et « l'état particulier » de ces antigènes, leur conférant ou non le pouvoir de provoquer, chez l'animal approprié, l'apparition des anticorps homologues. Comment caractériser l'« état particulier » dont nous venons de parler? On serait tenté de le dénommer état physique (variable), par opposition à la constitution chimique (toujours la même); mais il conviendrait, alors, de faire des hypothèses motivées sur la structure des antigènes et de définir, en général, un état physique et une constitution chimique. Inutile, pour le but que nous pour-

suivons aujourd'hui, d'aborder des questions aussi ardues. Elles seront soulevées ailleurs.

Facteur animal. — Si les *microbes* apparaissent plus ou moins *agglutinogènes*, l'*animal*, lui, se montre plus ou moins *agglutinopoïétique* (vis-à-vis des divers antigènes élémentaires et sans rapport forcé avec leurs quantités respectives). C'est, avant tout, affaire d'espèce; mais, subsidiairement, de conditions physiologiques et pathologiques.

[*Traitement suivi.* — Masse de germes injectée; intervalles séparant les injections; voie employée.]

Action des anticorps.

Elle se trouve liée : au microbe, au sérum et aux circonstances expérimentales. Nous négligerons d'autant mieux ces dernières (maintenues invariables dans nos recherches) qu'il s'agit ici d'effets *in vitro*, donc relativement simples.

Facteur microbe. — Mêmes réflexions que tout à l'heure. Ajoutons-y l'indépendance du pouvoir agglutinogène et de l'agglutinabilité, que révèle immédiatement notre tableau.

Facteur sérum. — Il faut considérer sa teneur en *anticorps élémentaires* et, certainement aussi, l'« état particulier » de ces anticorps. L'interaction des microbes et des agglutinines est régie non seulement par des rapports de quantité, mais encore par des rapports d'intensité — comme l'interaction des microbes et de l'organisme antipoiétique — *comme*, au surplus, *tous les phénomènes naturels*. Les variations d'intensité, si importantes, ne font que refléter les variations de l'« état particulier » des antigènes et des anticorps.

[Rappelons que les propriétés des sérums se modifient avec l'âge et le genre de conservation. On peut aussi les modifier artificiellement.]

Explication et sens des recherches actuelles.

Les quelques vues théoriques, que l'on vient de résumer, permettront de comprendre, sans réelle difficulté, les anomalies inattendues qui semblent le résultat le plus clair de nos expériences.

Absence de « carrés » bien délimités sur le tableau.

(Révélant une absence de spécificité dans les interactions des trois groupes de sérums et des trois groupes de germes.) La raison en est double. D'abord, les antigènes τ , α et β ne sont pas propres respectivement aux seuls groupes τ , α et β , mais communs à ces trois collectivités (et à d'autres). Ensuite, parmi les espèces animales couramment employées, c'est certainement le lapin qui offre le domaine « antipoiétique » le plus étendu (voir, là-dessus, les recherches de l'un de nous et de Césari. (*Journ. de Phys. et de Path. générale*, septembre 1915.) On conçoit donc le caractère forcément diffus de notre tableau.

Nous venons de dire que les antigènes τ , α et β n'étaient pas spéciaux aux seuls groupes τ , α et β , mais communs aux trois collectivités. Où trouver la preuve de l'existence réelle de ces curieuses substances? Dans les *cas exceptionnels*, déjà mentionnés et que nous allons rappeler.

L'échantillon 48, τ type (au point de vue de ses caractères biologiques) engendre un sérum qui agglutine tous les τ , un seul α et nul β . Il ne contient donc qu'une agglutinine spécifique, à laquelle répond spécifiquement l'antigène habituellement dominant chez les τ (*l'antigène typhique*, peut-on dire sans inconvénient dans l'état actuel de nos connaissances). L'échantillon 35 se comporte presque de même. — L'échantillon 66, α type (au point de vue de ses caractères biologiques) engendre un sérum qui agglutine tous les α , nul τ , nul β . Il ne contient donc qu'une agglutinine spécifique, à laquelle répond spécifiquement l'antigène habituellement dominant chez les α (*antigène paratyphique A*). L'échantillon 22 se comporte presque de même. — L'échantillon 64, β type (au point de vue de ses caractères biologiques), engendre un sérum qui agglutine la grande majorité des β , 1 seul τ et nul α . Il ne contient donc qu'une agglutinine spécifique, à laquelle répond spécifiquement l'antigène habituellement dominant chez les β (*antigène paratyphique B*). Parmi les germes anormaux, nous rencontrerons l'échantillon 33, qui se comporte de même.

[On nous pardonnera la forme, *volontairement monotone*, avec laquelle nous avons cru devoir établir l'existence réelle des

trois types d'antigènes. Il nous a paru nécessaire de *marteler* ainsi notre démonstration.]

Les sérums 48, 56 et 64 constituent des réactifs parfaits, pour l'identification des τ , α et β .

Au point de vue de l'agglutinabilité (et non plus du pouvoir agglutinogène), il n'existe pas d'échantillons offrant un caractère spécifique; sauf, cependant, parmi les groupes anormaux, où nous trouvons (*vide infra*) les n^{os} 24, 29, 33 et 34, agglutinés par la majorité des sérums B, peu de sérums T (1-4) et nul sérum A (le n^o 33 se montre également spécifique, dans sa propriété agglutinogène).

L'électivité des « bons » sérums, obtenus chez les lapins, tient donc à une *action exclusive* sur les τ , α ou β . Nous verrons que l'électivité des sérums, obtenus chez les chevaux, tient essentiellement à une *action dominante*.

*Absence habituelle de rapport
entre le pouvoir agglutinant des sérums et l'agglutinabilité
des échantillons, dans l'ensemble du tableau.*

(Révélant l'absence habituelle de rapport entre le pouvoir agglutinogène et l'agglutinabilité de ces échantillons, puisque l'espèce choisie demeure constante). Si l'on ne peut définir clairement le « rapport normal » de deux propriétés, on perçoit cependant fort bien tout écart notable et la disparition de l'une d'elles crève les yeux.

Chez certains échantillons, le « rapport normal » demeure constant, mais la richesse ou la pauvreté en antigènes élève ou abaisse parallèlement la valeur de ses deux termes (pouvoir agglutinogène *et* agglutinabilité forts ou faibles). Ailleurs, on rencontre ces discordances, d'étendue variable, si fréquentes dans notre tableau et susceptibles d'opposer à un type de pouvoir agglutinogène un type d'agglutinabilité radicalement différent. Enfin, on peut voir manquer le seul pouvoir agglutinogène (le bacille n^o 6, anormal, essentiellement inagglutinogène, se révèle fort agglutinable). Le bacille Shiga-Dopter, étudié jadis au laboratoire (M. Nicolle, E. Debains et G. Loiseau. — Ces *Annales*, août 1910), offrait des caractères opposés; nous

le rappelons ici, ne possédant pas d'exemple analogue dans le domaine des τ , α et β .

On peut voir, sur le tableau, que plusieurs de nos échantillons demeurent insensibles à leur propre sérum (n^{os} 10, 30, 37 pour les τ ; 56 pour les α ; 35, 63 pour les β).

Dans les trois « carrés », arbitrairement délimités, réciprocité fréquente entre le pouvoir agglutinant des sérums et l'agglutinabilité des germes chez les τ et les α , moins habituelle chez les β .

Cela veut dire que le rapport entre le pouvoir agglutinogène et l'agglutinabilité de l'antigène τ (ou α) est fréquent chez les τ (ou α), tandis que le rapport entre le pouvoir agglutinogène et l'agglutinabilité de l'antigène β l'est moins chez les β .

Toute discordance se traduit, naturellement, dans le tableau, par des « zéros ». Les zéros révèlent aussi le phénomène suivant : un germe bien agglutinable peut demeurer insensible au sérum qu'engendre un germe bien agglutinogène *de la même famille* (exemple, pris au hasard; l'échantillon n^o 38 et le sérum n^o 3). Il faut en conclure qu'entre l'antigène du premier microbe et celui du second, antigènes de même type (τ , dans l'exemple choisi), existent certaines différences de structure (sans doute légères). De telles différences ont été démontrées chez les pneumocoques, par des expériences irréfutables (A. Raphael : *De l'immunité antipneumococcique*. Thèse de doctorat en médecine, Paris, 1916).

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES (ÉCHANTILLONS ANORMAUX)

Nous analyserons, successivement, ces échantillons, d'après le groupement établi dans le mémoire précédent.

Groupe 1.

Un seul représentant, le n^o 39, a été étudié.

Sérum 39. — Absence de spécificité (type T + A, avec action étendue sur les β).

Echantillon 39. — Absence de spécificité (type $\tau + \beta$, avec agglutination par plus de la moitié des A).

Donc : indétermination (avec les sérums de lapins, naturellement).

Groupe 2.

Non étudié.

Groupe 3.

Seul représentant, le n° 6.

Sérum 6. — Inactif sur tous les germes.

Echantillon 6. — Absence de spécificité (type $\tau + \beta$, avec agglutination par les $\frac{2}{3}$ des A).

Donc : indétermination.

Groupe 4.

Un seul représentant, le n° 7, a été étudié.

Sérum 7. — Absence de spécificité (type A + T, action B négligeable).

Echantillon 7. — Absence de spécificité (type $\alpha + \tau + \beta$).

Donc : indétermination.

Groupes 5 et 6.

Non étudiés.

Groupe 7.

Sérum 24. — Absence de spécificité (type A + B + T).

Echantillon 24. — C'est un β (action A = 0, action T négligeable).

Sérum 33. — C'est un sérum B (action sur les α = 0, action sur les τ négligeable).

Echantillon 33. — C'est un β (action A = 0, action T négligeable).

Sérum 34. — Absence de spécificité (type T + A + B).

Echantillon 34. — C'est un β (action A = 0, action T négligeable).

Donc : au point de vue agglutinogène, le n° 33 seul est un β , les deux autres demeurent indéterminés; au point de vue de l'agglutinabilité, les trois échantillons sont des β (et les « meilleurs » de tous).

Groupe 8.

Sérum 27. — C'est un sérum B (faible; action sur les α nulle, action sur les τ négligeable).

Echantillon 27. — Absence de spécificité (action B + T peu étendue, action A = 0).

Sérum 28. — Absence de spécificité (type T + A, avec action sur les B dans la moitié des cas).

Echantillon 28. — Absence de spécificité (action B + T peu étendue, action A = 0).

Sérum 29. — Absence de spécificité (agglutine 53 échantillons sur 54, comme le sérum 19 — n'agglutine pas le n° 6, alors que le sérum 19 n'agglutine pas le n° 4).

Echantillon 29. — C'est un β (action A = 0, action T négligeable).

Donc : au point de vue agglutinogène, le n° 27 seul est un β , les deux autres demeurant indéterminés ; au point de vue de l'agglutinabilité, le n° 29 seul est un β , les deux autres demeurant indéterminés.

CONCLUSIONS.

Il est curieux de voir que, parmi nos échantillons anormaux, se rencontrent des germes spécifiques quant à leur pouvoir agglutinogène (n° 27), quant à leur agglutinabilité (n°s 24, 29, 34) et même quant à ces deux propriétés (n° 33). La proportion est bien plus forte que parmi les germes normaux.

Il n'existe donc aucun rapport forcé entre la distribution des caractères biologiques et la distribution des caractères antigènes. [Ces derniers peuvent revêtir le type spécifique, soit dans le sens du pouvoir agglutinogène, soit dans le sens de l'agglutinabilité, soit dans les deux sens.]

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les recherches exposées ici « illustrent », d'une façon schématique, la conception des microbes envisagés comme « mosaïques d'antigènes » et pas seulement comme « mosaïques de propriétés biologiques ».

Elles suggèrent, par là même, des idées complètement nouvelles sur l'immunisation active ou passive et les moyens de la réaliser.

Elles démontrent que le pouvoir agglutinogène et l'agglutinabilité représentent deux caractères distincts. Chez les bacilles typhiques et les bacilles paratyphiques A, l'agglutinabilité

(générale) l'emporte sur le pouvoir agglutinogène (général), alors que le contraire s'observe chez les bacilles paratyphiques B.

Malgré la coexistence habituelle des trois antigènes élémentaires (typhique, paratyphique A et paratyphique B) dans l'ensemble des germes étudiés, elles ont permis d'obtenir des sérums rigoureusement spécifiques avec certains échantillons et d'escompter le même résultat chez le cheval — *l'expérience justifiera cet espoir.*

Grâce à la coexistence habituelle des trois antigènes, elles ont permis d'obtenir des sérums omnivalents et d'escompter le même résultat chez le cheval — *l'expérience démontrera le contraire.*

ÉTUDES SUR LE BACILLE D'EBERTH ET LES BACILLES PARATYPHIQUES

(TROISIÈME MÉMOIRE)

AGGLUTINATION DE 70 ÉCHANTILLONS EN PRÉSENCE DE SÉRUMS DE CHEVAUX IMMUNISÉS

par M. NICOLLE, E. DEBAINS et M^{lle} A. RAPHAEL

Dans le mémoire précédent, nous avons établi que certains germes étaient capables d'engendrer, chez les lapins, des sérums spécifiquement agglutinants : tels, les n^{os} 48 (bacille typhique — abrégativement bacille τ ou τ), 66 (bacille paratyphique A — bacille α ou α) et 64 (bacille paratyphique B — bacille β ou β) — et, qu'inversement, d'autres germes fournissaient des sérums omnivalents : tels, les n^{os} 19 (β normal) et 29 (β anormal). Les sérums spécifiques n'agglutinent qu'une seule catégorie de microbes, les sérums omnivalents agissent sur tous les échantillons (sauf un).

Des chevaux ont été immunisés avec les cinq germes indiqués ; le travail actuel exposera les résultats obtenus. Mentionnons, immédiatement, les faits suivants. D'abord, la spécificité des sérums 48 (abrégativement sérum T ou T), 66 (sérum A ou A) et 64 (sérum B ou B), escomptée d'avance. Ensuite, la spécificité des sérums 19 (sérum II ou II) et 29 (sérum P ou P), inattendue ; ces deux sérums se comportent comme des sérums B typiques. Nous avons déjà annoncé, dans le mémoire précédent, que la spécificité des sérums équins n'était pas due, comme celle des sérums engendrés par les lapins, à une action exclusive sur tel des trois groupes de germes, mais, d'ordinaire, à une action dominante ; on montrera, ici,

que cette dominance concorde absolument avec le caractère exclusif observé ailleurs. Ajoutons, enfin, que l'étude comparée des sérums B, II et P prouve la supériorité du sérum P sur les deux autres sérums antiparatyphiques B. Aussi avons-nous choisi le dernier pour « réactif antigène » (à côté des sérums T et A). Peu importe que le sérum P soit fourni par un β , anormal quant aux caractères biologiques, puisque nos recherches antérieures ont révélé l'absence de rapport forcé entre ces caractères et les caractères antigènes.

Nous suivrons, dans notre mémoire actuel, le même plan que dans le travail précédent.

IMMUNISATION DES ANIMAUX

On s'est servi, exclusivement, de germes tués par l'alcool-éther et obtenus comme il suit :

On ensemence une série de boîtes de Roux, contenant de la gélose à la pomme de terre (ces *Annales*, juillet 1903). Après 24 heures (37°) : émulsion des dépôts microbiens en eau physiologique et turbinage (centrifuge de Jouan). On traite ensuite les culots par un excès d'alcool-éther (aā) et, le lendemain, on dessèche la masse bactérienne vers 40° (appareil de Jouan).

Les chevaux, dont l'observation complète sera rapportée ailleurs, ont reçu, d'abord sous la peau puis dans les veines, des émulsions de « bacilles alcool-éther » bouillies pendant 5 minutes.

PRÉPARATION DES SUSPENSIONS MICROBIENNES

Les germes, cultivés sur gélose-pomme de terre (sans eau de condensation), en partant d'une semence jeune sur gélose Martin, étaient émulsionnés, après 24 heures d'étuve, dans l'eau physiologique, à raison d'un centigramme de corps bacillaires par 20 cent. cubes de solution saline (NaCl 1 p. 100).

TECHNIQUE DE L'ACGLUTINATION

On ajoutait, pour 1 cent. cube d'émulsion : 1/200 (*limite inférieure, que nous avons cru devoir adopter*), 1/500, 1/1.000, 1/2.000 ... de cent. cube de sérum (soit : $0,5 \cdot 10^{-2}$, $2 \cdot 10^{-3}$,

10^{-3} , $0,5.10^{-3}$... cent. cube). Après mélange intime, les tubes, fermés au coton, demeuraient sur la table du laboratoire pendant 24 heures; la lecture se faisait ensuite à l'œil nu (aidé de la loupe).

NOTATIONS EMPLOYÉES
DANS LE TABLEAU QUI RÉSUME LES EXPÉRIENCES

Il nous a paru avantageux de remplacer les chiffres (sauf le signe 0) par des lettres, d'une lecture bien plus facile. Voici le sens de ces lettres.

(0 = agglutination nulle avec $0,5.10^{-2}$ cent. cube de sérum.)

b = agglutination incomplète (*mais très nette*) avec $0,5.10^{-2}$ cent. cube de sérum.

B = agglutination complète avec $0,5.10^{-2}$, habituellement incomplète (rarement nulle) avec 2.10^{-3} .

	BACILLES TYPHIQUES																			B. PARATYPHIQUES A									
SÉRUMS.	2	9	10	11	12	13	16	17	18	20	30	35	36	37	38	48	58	61	63	68	22	23	56	59	66	67	69	70	71
T. . .	H	F	b	G	H	H	G	G	H	G	B	H	G	G	H	G	G	G	F	G	b	C	b	C	0		C	B	0
A. . .	C	b	0	C	D	B	b	B	B	b	C	B	C	B	0	b	b	b	B		H	E	F	F	H	H	I	I	G
P. . .	D	C	b	D	D	E	D	E	B	B	b	E	D	C	C	0	B	B	C	E	C	b	C	D	B	D	D	D	B

	BACILLES PARATYPHIQUES B																G. 1		G. 2		G. 3		G. 4	
SÉRUMS.	1	3	4	8	14	15	19	25	26	31	32	57	60	64	65	80	39	97	52	124	6	7	115	
T. . .	D	E	D	B	B	C	B	B	C	B	B	C	B	D	H	D	G	G	0	G	G	B	F	
A. . .	B	B	0	B	C	C	B	C	C	C	B	b	B	B	G	b	B	0	0	0	D	D	E	
P. . .	G	E	D	H	H	G	E	G	G	I	H	F	G	G	H	D	B	D	0	0	E	b	G	

	GROUPE 5											G. 6		G. 7			G. 8		
SÉRUMS.	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	95	24	33	34	27	28	29	
T. . .	B	0	0	0	B	0	0	0	0	0	B	0	B	B	B	E	B	B	
A. . .	G	G	G	F	G	G	G	G	G	F	G	0	C	b	b	0	b	B	
P. . .	D	B	C	0	C	B	C	B	B	B	B	0	H	F	F	G	G	G	

C = agglutination complète avec 2.10^{-3} , habituellement incomplète (rarement nulle) avec 10^{-3} .

D = agglutination complète avec 10^{-3} , habituellement incomplète (rarement nulle) avec $0,5.10^{-3}$.

E = agglutination complète avec $0,5.10^{-3}$, habituellement incomplète (rarement nulle) avec 2.10^{-4} .

Et ainsi de suite...

Remarques. — Tous les échantillons, étudiés ici, figurent dans notre premier mémoire. — Aucun d'eux n'est agglutiné à $0,5.10^{-2}$ par le sérum équin normal.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES (ÉCHANTILLONS NORMAUX)

POUVOIR AGGLUTINANT DES SÉRUMS.

Sérum T (cheval n° 855; 15° saignée).

Action sur les bacilles τ . — Constante; minimum b, maximum H.

Action sur les bacilles α . — 2 fois nulle; minimum b, maximum C.

Action sur les bacilles β . — Constante; minimum B, maximum E (exceptionnellement, H, avec le n° 65).

Donc : valeur absolue du sérum : $> E$, c'est-à-dire $> 0,5.10^{-3}$ (sauf avec le n° 65).

Le sérum T constitue un réactif parfait pour l'identification des bacilles τ , puisqu'il exerce son effet spécifique, sur eux, dans les neuf dixièmes des cas et qu'il n'offre la même électivité que sur un seul germe étranger, de nature manifestement exceptionnelle.

Sérum A (cheval n° 857; 14° saignée).

Action sur les bacilles τ . — 2 fois nulle; minimum b, maximum D.

Action sur les bacilles α . — Constante; minimum E, maximum I.

Action sur les bacilles β . — 3 fois nulle; minimum b, maximum C (G, exceptionnellement, avec le n° 65).

Donc : valeur absolue du sérum : $> D$, c'est-à-dire $> 10^{-3}$ (sauf avec le n° 65).

Le sérum A constitue un réactif parfait pour l'identification des bacilles α , puisqu'il exerce son effet spécifique, sur eux,

dans tous les cas et qu'il n'offre la même électivité que sur un seul germe étranger, de nature manifestement exceptionnelle.

Sérum P (cheval n° 858; 13° saignée).

Action sur les bacilles τ . — 1 fois nulle; minimum b, maximum E.

Action sur les bacilles α . — Constante; minimum b, maximum D.

Action sur les bacilles β . — Constante; minimum D, maximum I.

Donc : valeur absolue du sérum : $> E$, c'est-à-dire $> 0,5.10^{-3}$.

Le sérum P constitue un *assez bon* réactif pour l'identification des bacilles β ; il exerce son effet spécifique, sur eux, dans les trois quarts des cas.

Le sérum B (cheval n° 856; 14° saignée), préparé avec l'échantillon 64, se montre moins actif que le sérum P. Le sérum II (cheval n° 854; 15° saignée), préparé avec l'échantillon 19, n'exerce son effet spécifique qu'au-dessus de F (2.10^{-4}). Le choix du sérum P, comme agent d'identification, est donc parfaitement légitime. Nous lui gardons le nom de sérum P (et non B), pour ne pas amener de confusion dans l'ensemble de nos notes et dans des travaux ultérieurs, où il figurera de nouveau, ainsi que d'autres sérums antiparatyphiques B.

AGGLUTINABILITÉ DES GERMES.

Échantillons τ .

Agglutination constante avec le sérum T, presque constante avec le sérum P, inconstante avec le sérum A. Dans la règle, les bacilles typhiques sont influencés par les trois sérums, avec dominance du sérum T.

Valeur réactive des échantillons pour lesquels on trouve un chiffre $> E$ ($0,5.10^{-3}$). Certains τ se montrent plus agglutinables par le sérum T que le n° 48.

Echantillons particuliers. — N° 48 : tout à fait spécifique — n° 10 : ne réagit qu'aux sérums T et P et encore faiblement (*indétermination*) — n° 30 : réagit aux trois sérums, mais peu (*indétermination*).

Échantillons α .

Agglutination constante avec les sérums A et P, inconstante avec le sérum T. Dans la règle, les bacilles paratyphiques A sont influencés par les trois sérums, avec dominance du sérum A.

Valeur réactive des échantillons pour lesquels on trouve un chiffre $> D$ (10^{-3}). Certains α se montrent plus agglutinables par le sérum A que le n° 66.

Echantillons particuliers. — N°s 66 et 74; relativement spécifiques, en ce sens qu'ils ne réagissent pas au sérum T.

Échantillons β .

Agglutination constante avec les sérums P et T, inconstante avec le sérum A. Dans la règle, les bacilles paratyphiques B sont influencés par les trois sérums, avec dominance du sérum P.

Valeur réactive des échantillons pour lesquels on trouve un chiffre $> E$ ($0,5.10^{-3}$) — unique exception : le n° 65. Certains β se montrent plus agglutinables par le sérum P que le n° 29.

Echantillons particuliers. — N° 65: réagit également et fortement aux trois sérums (*indétermination*) — n°s 3 et 80 : réagissent autant au sérum T qu'au sérum P (*indétermination*) — n° 4: de même; ne réagit point au sérum A.

CONCLUSIONS.

Les sérums T, A et P constituent d'*excellents réactifs d'identification*. Ils ne sauraient permettre de classer tous les échantillons, pour la bonne raison que certains de ces échantillons sont anormaux dans leur « structure antigène » — de même, les meilleurs milieux d'épreuve ne consentent pas « la moindre complaisance » vis-à-vis des germes dont les caractères biologiques demeurent irréguliers. Les bacilles paratyphiques B se montrant les plus anormaux dans leur structure antigène, il en résulte que le sérum P demeure forcément inférieur aux sérums T et A, comme valeur diagnostique.

L'échantillon 48 représente un typhique parfait, puisqu'il ne réagit qu'au seul sérum T; les échantillons 66 et 74, des para-

typhiques A relativement parfaits, puisqu'ils réagissent au sérum P, mais non au sérum T; les échantillons 19 et 64, des paratyphiques B sans « supériorité » aucune. Il ne faut d'ailleurs pas s'exagérer l'*excellence* des germes 48, 66 (et, sans doute, 71), quant à leur agglutinabilité. C'est affaire de sérums (proprement, de saignées). Nous étudierons, au moment voulu, les caractères des sérums T, A et P, sur les échantillons 48, 66, 19, 29 et 64, lors des diverses saignées consécutives; mentionnons simplement les particularités suivantes.

Sérum T. — Il agglutine peu ou pas le n° 66, jusqu'à la 15^e saignée; puis, il l'agglutine régulièrement.

Sérum A. — Il agglutine peu ou pas le n° 48, jusqu'à la 14^e saignée; puis, il l'agglutine régulièrement (sauf lors de la 15^e).

Sérum P. — Il agglutine régulièrement le n° 48, avant et après la 13^e saignée (sauf lors de la 14^e).

Par conséquent, dans la règle et sous le volume, arbitrairement choisi, de $0,5.10^{-2}$ cent. cube, les trois sérums n'offrent qu'une spécificité quantitative, comme nous l'avons dit et répété. Quantitative, également (et non moins précieuse en ses indications), apparaît la spécificité correspondante des germes. Et, *ici comme partout*, on ne peut mesurer exactement des différences de qualité que par des différences de quantité.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES (ÉCHANTILLONS ANORMAUX)

Groupe 1.

N^{os} 39 et 97. — Ce sont des typhiques (au point de vue antigène, naturellement).

Groupe 2.

N^{os} 52 et 124. — Le n° 52, inagglutinable, demeure *indéterminé* (il faudrait étudier son pouvoir agglutinogène). Le n° 124 est un typhique parfait.

Groupe 3.

N° 6. — C'est un typhique.

Groupe 4.

N^{os} 7 et 115. — Le n^o 7 est un paratyphique A; le n^o 115, presque également sensible aux trois sérums, demeure *indéterminé*.

Groupe 5.

N^{os} 126 ... 136. — Ce sont des paratyphiques A. Plus des 2/3 ne sont pas agglutinés par le sérum T; le n^o 129 l'emporte, comme « perfection », sur les n^{os} 66 et 71; quatre échantillons correspondent à ce dernier, comme types d'agglutinabilité.

Groupe 6.

N^o 95. — Inagglutinable; *indéterminé*.

Groupe 7.

N^{os} 24, 33 et 34. — Ce sont des paratyphiques B; les n^{os} 33 et 34 sont à peine agglutinés par le sérum A.

Groupe 8.

N^{os} 27, 28 et 29. — Ce sont des paratyphiques B; le n^o 27 n'est pas agglutiné par le sérum A, le n^o 28 à peine.

CONCLUSIONS.

Parmi les 25 échantillons, anormaux au point de vue des caractères biologiques, 23 se sont révélés normaux au point de vue des caractères antigènes (l'agglutination étant utilisée comme moyen d'analyse). Les sérums équins ont permis d'identifier tous les germes que les sérums des lapins (moins efficaces) laissaient indéterminés.

Parmi les 45 échantillons, normaux au point de vue des caractères biologiques, 6 se sont révélés anormaux au point de vue des caractères antigènes. Mentionnons que le sérum II permet d'en identifier deux (n^{os} 3 et 80), comme paratyphiques B.

Ainsi que nous le disions dans le mémoire précédent, il n'existe aucun rapport forcé entre la distribution des caractères biologiques et celle des caractères antigènes. Pourquoi

s'en étonner? Ne sait-on pas que le bacille Flexner-origine se montre habituellement plus sensible au sérum Shiga-origine qu'au sérum Flexner-origine? Cependant, les bacilles de Flexner et de Shiga constituent des espèces radicalement distinctes. Ne sait-on pas que l'« antigène Forssman » peut être décelé, sans peine, dans le sérum de mouton, les hématies de mouton, le rein de cobaye, le rein de cheval, le testicule de cobaye... (M. Nicolle et Césari, *Journ. de Phys. et de Path. générale*, septembre 1915) — comme la propriété de fermenter tel ou tel sucre, dans les cellules animales, végétales ou microbiennes les plus diverses?

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Chacun de nos trois sérums révèle, par son action habituellement dominante sur tel des trois groupes microbiens, l'existence, au sein de ce groupe, d'un antigène habituellement dominant.

Quelle est la valeur respective des caractères biologiques et des caractères antigènes? Il ne saurait être question de différence hiérarchique, puisque ces caractères n'offrent point de commune mesure et présentent même volontiers des anomalies indépendantes. Il faut donc se borner à souligner l'utilité particulière de chacun d'eux.

On ne peut « partir », dans une étude rigoureuse, que d'échantillons strictement légitimes au point de vue biologique, tout le reste étant basé sur cette légitimité des « germes de référence ».

On ne peut employer, soit pour obtenir des sérums spécifiques, soit pour révéler la spécificité des sérums (séro-identification des microbes, séro-diagnostic des maladies), que des échantillons strictement légitimes au point de vue antigène (normaux ou non, au point de vue biologique, peu importe). Même nécessité, en ce qui concerne l'immunisation active de l'homme et des animaux.

Les caractères biologiques ne sont donc pas « meilleurs » que les caractères antigènes et *vice versa*. Tous deux doivent faire l'objet de recherches parallèles, également indispensables.

QUELQUES COLORANTS ET PROCÉDÉS DE COLORATION

par L. TRIBONDEAU.

Mon but, en écrivant le présent article, est de rassembler et de préciser quelques travaux sur les colorations microscopiques que j'ai effectués au cours de ces dernières années, pour la plupart en collaboration avec MM. M. Fichet et J. Dubreuil (1).

I. — RÈGLES GÉNÉRALES APPLICABLES AUX COLORATIONS PAR TOUS LES ÉOSINATES DE MÉTHYLÈNE.

Les éosinates de méthylène (Laveran, bi-éosinate, azéo, Leishman, Giemsa, etc...) permettent d'obtenir des colorations microscopiques remarquables, à la condition d'observer rigoureusement quelques règles générales de technique relatives à l'eau, à la verrerie et aux manipulations des préparations.

1° L'eau. — Le choix de l'eau a une importance capitale. Il ne suffit pas qu'elle soit distillée, elle doit aussi être parfaitement pure et neutre. Or bien des eaux distillées du commerce ne réalisent pas ces conditions. Le plus souvent, l'impureté n'est pas décelable par les réactifs chimiques ordinaires (tournesol, phthaléine), mais les globules rouges du sang se chargent de la mettre en évidence, car leur coloration, qui tire sur le jaune brun quand l'eau est neutre, tourne au bleu ou au rouge en cas d'alcalinité ou d'acidité. Une eau impure doit être rectifiée, surtout quand elle est acide, parce que, si une légère alcalinité est encore compatible avec l'obtention de préparations utilisables, une acidité même légère a par contre une influence désastreuse. En principe, il serait même préférable de ne pas attendre les indications fournies par les globules rouges et de

(1) Voir *Index bibliographique*.

n'employer pour les colorations par les éosinates que de l'eau distillée épurée. Ce n'est d'ailleurs pas là une bien grande complication, puisqu'il suffit d'additionner l'eau d'un peu de carbonate d'argent (par exemple 0 gr. 05 par litre) et de la redistiller : le sel d'argent fixe énergiquement les acides, aldéhydes, chlorures, etc...

Le carbonate d'argent s'obtient en versant, dans une solution aqueuse de nitrate d'argent à 10 p. 100 par exemple, de la solution aqueuse de carbonate de soude à 20 p. 100 jusqu'à cessation de précipitation. Le précipité est lavé abondamment par adjonction d'eau distillée, agitation et décantation successives et répétées. Finalement il est utilisé encore humide, ou jeté sur filtre et desséché.

Quant à la distillation elle-même, elle peut être réalisée à peu de frais dans les laboratoires. Elle demande, pour tout matériel spécial, un tube réfrigérant (genre Liebig ou Aubin); à la rigueur on peut transformer en manchon réfrigérant un verre de lampe fermé avec deux bouchons à deux trous. On choisira, pour collecter la vapeur, un tube coudé du diamètre du petit doigt, à branche verticale assez longue et terminée par une extrémité taillée en biseau, de façon à empêcher les entraînements d'eau; dans le même but, on mettra dans le fond du ballon servant de cornue une couche de morceaux de verre qui s'opposera à une ébullition tumultueuse.

L'eau distillée purifiée sera conservée en flacons bien bouchés. Elle doit servir à *tous* les besoins des colorations sans exception, c'est-à-dire non seulement à la dilution des colorants mais encore au lavage des préparations.

2° Verrerie. — Le nettoyage des lames de verre, boîtes, cuvettes, pipettes et autres objets servant à plusieurs reprises est effectué d'habitude à l'aide de solutions acides ou alcalines fortes; il est donc nécessaire de le faire suivre d'un rinçage à l'eau minutieux et prolongé, puis d'un bon essuyage, pour éviter d'introduire dans les solutions colorantes ou dans l'eau distillée destinée aux lavages, des substances qui modifieraient leur réaction.

Une bonne précaution consiste à réserver pour les colorations par les éosinates un lot de récipients et de pipettes. Quant aux lames porte-objets, on aura soin de toujours les laver à l'alcool et de les bien essuyer avec un linge fin avant d'étaler le sang à leur surface; en outre, il est préférable d'éliminer les lames plus ou moins ternies et érodées, parce que les éosinates se fixent énergiquement sur tous les défauts du verre.

3° Manipulation des préparations. — Il faut éviter de déposer le sang sur des lames chauffées, de l'étaler en couche trop épaisse, de le laisser sécher trop lentement ou en milieu très humide, de le fixer par la chaleur ou par des réactifs quels qu'ils soient, enfin de le colorer trop longtemps après avoir été prélevé. Ce sont, en effet, là autant de causes d'insuccès qui agissent, soit en altérant les éléments microscopiques, soit en modifiant leurs affinités pour les colorants.

Il faut, d'autre part, se bien garder de hâter, par quelque moyen que ce soit, la précipitation spontanée des éosinates en présence de l'eau, parce que les préparations ne sont bonnes que si les bains colorants mettent un certain temps à précipiter. Or la précipitation est favorisée : 1° par une évaporation trop grande des solutions alcool-glycérinées d'éosinate au moment où on les utilise, pures, pour la fixation des frottis (surtout pendant la saison chaude); 2° par l'addition d'une quantité insuffisante d'eau à ces solutions lors de la coloration proprement dite; 3° par l'agitation des bains colorants. Dans le premier cas, le colorant, du fait de la perte en alcool qu'il a subie, non seulement précipite trop vite mais encore se comporte comme une solution acide, et teinte en rose les hématies; heureusement, un simple couvercle bas, une moitié de boîte de Petri par exemple, placé sur la préparation, réalise une protection très suffisamment efficace. Dans le deuxième cas, la solution précipite, parce que trop riche en éosinate; mais on n'a qu'à s'en tenir, pour les dilutions, aux indications précises fournies par les auteurs. Dans le troisième cas, le remède est encore plus simple : s'abstenir de remuer les bains colorants.

II. — PRÉPARATION DU BLEU BORREL MODIFIÉE.

Le bleu Borrel est, comme on le sait, du bleu de méthylène transformé à l'aide d'oxyde d'argent, puis débarrassé de ce corps par filtration. C'est un excellent colorant, utilisé surtout pour la coloration de Laveran, et entrant dans la composition du bi-éosinate. Récemment préparé, il semble contenir surtout du violet de méthylène et du bleu de méthylène non transformé; mais il se modifie en vieillissant, rougit et abandonne un précipité d'azur de méthylène.

On obtiendra un bon bleu Borrel en utilisant la technique suivante.

1^o PRÉPARATION DE L'OXYDE D'ARGENT. — Introduire 0 gr. 50 à 1 gramme de nitrate d'argent cristallisé dans un flacon à bouchon de verre d'une contenance supérieure à 150 cent. cubes, préalablement bien nettoyé et rincé à l'eau distillée; ajouter 100 cent. cubes d'eau distillée; dissoudre à froid en agitant.

Verser dans la solution d'argent, en une fois et rapidement, 50 cent. cubes de solution de potasse (oxyde de potassium pur, à l'alcool, 10 grammes; eau distillée, 100 cent. cubes); boucher aussitôt après le flacon, et, le saisissant par le goulot de telle façon que le bouchon ne puisse pas s'échapper, le secouer pendant quelques secondes. Laisser ensuite au repos pendant une minute environ; décanter et rejeter le liquide surnageant trouble et brunâtre; s'arrêter quand on arrive au lourd précipité d'oxyde d'argent qui s'est collecté au fond du récipient.

Verser sur le dépôt, de nouvelle eau distillée; boucher, secouer, laisser reposer, et décanter comme ci-dessus. Recommencer à 3 ou 4 reprises ces opérations de lavage du précipité, et le transvaser dans un ballon.

2^o TRANSFORMATION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE. — Préparer une solution de 1 gramme de bleu de méthylène médicinal pur français (Saint-Denis; Pharmacie centrale de France), dans 100 cent. cubes d'eau distillée.

La vider sur le dépôt d'oxyde d'argent lavé provenant de 0 gr. 50 de nitrate d'argent si le bleu Borrel est destiné à la coloration de Laveran, ou sur le précipité fourni par 0 gr. 75 à 1 gramme de nitrate d'argent si le bleu Borrel doit servir à la fabrication du bi-éosinate.

Bien mélanger; chauffer au bain-marie en agitant de temps en temps; surveiller le changement de couleur à partir du moment où le bain entre en ébullition. Il faut obtenir une teinte d'un beau violet bleu, sans excès de rouge, indice d'une transformation trop grande. Le bleu Borrel destiné à la préparation du bi-éosinate doit être d'un violet un peu plus rouge que celui destiné à la coloration de Laveran. L'appréciation exacte de la teinte favorable réclame une certaine habitude de cette manipulation. Elle est obtenue en quelques minutes d'ébullition. Il vaut mieux s'arrêter à une teinte trop bleue que de dépasser le but; on en est quitte pour laisser ensuite le colorant mûrir pendant quelques jours à la température ordinaire.

Filter pour éliminer l'oxyde d'argent.

III. — COLORATION DE LAVERAN MODIFIÉE.

La méthode originale de Romanovsky utilisait deux solutions aqueuses, l'une de bleu de méthylène devenue alcaline par vieillissement en récipient de verre, l'autre d'éosine, qui, mélangées en proportions convenables, donnaient naissance à un éosinate possédant la propriété de colorer la chromatine des protozoaires, alors que ni l'éosine, ni le bleu n'avaient ce pouvoir. Mais l'activité du mélange était très variable suivant la qualité du bleu.

Laveran a eu le grand mérite de préconiser un bleu d'action beaucoup plus constante : le bleu Borrel. Sa méthode de coloration donne des préparations de parasites du sang très belles et très instructives. Toutefois, elle est moins employée depuis que les solutions alcooliques d'éosinates permettent d'obtenir plus facilement des colorations complètes.

J'ai utilisé pendant longtemps la coloration de Laveran, et j'ai trouvé qu'il y a avantage 1° à se servir de bleu Borrel fabriqué comme il a été dit plus haut, et d'une éosine française au lieu d'une éosine de la fabrique de Höchst; 2° à rechercher préalablement, par une *épreuve de précipitation* appropriée, les proportions dans lesquelles les deux colorants doivent être mélangés.

ÉPREUVE DE PRÉCIPITATION. — Elle consiste à disposer sur un porte-tubes 10 petits tubes, dans lesquels on distribue, à l'aide d'une pipette donnant d'assez grosses gouttes : 1° de la solution d'éosine française (Saint-Denis) à 1 p. 1.000 dans l'eau distillée, à doses croissant d'une goutte par tube (soit : 1 goutte dans le premier tube, 10 dans le dernier); 2° du bleu Borrel à la dose uniforme de 1 goutte par tube. On mélange aussitôt en secouant les tubes, puis, sans perdre de temps, on prélève dans chacun d'eux, à l'aide d'une anse de platine et en commençant par le plus pauvre en éosine, une goutte du mélange qu'on dépose sur une lame de verre. On s'arrête au premier tube où l'on constate l'existence d'un précipité. On fait un deuxième prélèvement 10 ou 15 minutes après le précédent et on recherche de la même façon dans quel nouveau tube commence le précipité.

C'est entre les deux tubes ainsi déterminés que se trouvent les meilleurs mélanges colorants. En deçà et au delà, les mélanges colorent mal parce qu'ils précipitent trop lentement ou trop vite. Les proportions optima d'éosine et de bleu sont, en général, celles du mélange contenu dans le tube précédent de deux rangs celui où l'on a constaté la première précipitation immédiate. Ces proportions sont le plus souvent : 4 parties de solution d'éosine à 1 p. 1.000 pour 1 partie de bleu Borrel.

Mode d'emploi des colorants. — Les préparations de sang sont fixées à l'alcool absolu (3 minutes).

Prenons pour exemple le cas où on utilise une boîte de Laveran à 3 places. Mesurer 20 cent. cubes d'eau distillée; les verser, par moitiés, dans 2 verres à pied. Ajouter dans l'un 1 cent. cube de bleu Borrel, et dans l'autre la proportion optima d'éosine (Saint-Denis) à 1 p. 1.000 (ordinairement 4 cent. cubes). Vider la solution de bleu dans celle d'éosine, et transvaser immédiatement le mélange dans la boîte de Laveran. Plonger dans ce bain les préparations face enduite en bas, après avoir ratissé le

voile de surface. Laisser colorer pendant environ 20 minutes, sans agiter, et à froid, pour les recherches ordinaires; prolonger le contact pendant 30 minutes et, de préférence, dans l'étuve à 37°, si l'on veut mettre en évidence certains détails difficiles à colorer, tels que les granulations de Schüffner. Laver à l'eau distillée. Sécher rapidement au papier filtre, et en s'aidant modérément d'une flamme.

RÉSULTATS. — Les préparations ne diffèrent de celles que donne la méthode classique de Laveran, que par leur finesse et leur propreté qui m'ont semblé plus grandes.

IV. — MÉTHODE ORIGINALE POUR LA FABRICATION DE L'AZUR ET DU VIOLET DE MÉTHYLÈNE.

La technique de Giemsa pour la fabrication de l'azur et du violet de méthylène purs ayant été gardée secrète, les laboratoires français étaient jusqu'ici tributaires des maisons allemandes pour ces produits et les solutions colorantes dans la composition desquelles ils entrent.

J'ai fait connaître récemment une méthode très simple de préparation qui nous délivre de cette sujétion.

Elle consiste à faire agir sur une solution de bleu de méthylène un réactif énergique et volatil, l'ammoniaque : le bleu est décomposé en azur qui précipite, et en violet qui reste dissous. Une filtration sépare les deux éléments, qui sont ensuite débarrassés complètement de l'ammoniaque par dessiccation. L'azur ainsi obtenu est-il identique à celui de Giemsa? Ce n'est pas probable si on en croit la dénomination de chlorhydrate d'azur qui a été donnée à ce dernier; mais il le vaut bien, et c'est là l'important. On trouvera ci-après quelques précisions sur la préparation dont le principe vient d'être exposé.

Faire une solution à 1 p. 100 de bleu de méthylène médicinal pur français (Saint-Denis) dans l'eau distillée. Lui ajouter 5 à 10 p. 100 d'ammoniaque liquide. Mélanger en ballon de verre. Chauffer au bain-marie jusqu'à ébullition du bain; il se forme un abondant précipité. Filtrer à chaud sur papier plissé.

Mettre le filtrat à évaporer en large cuvette photographique, à l'étuve vers 37°-40°. Le résidu de la dessiccation, recueilli par grattage, est du violet de méthylène pratiquement pur.

Un peu du précipité est tombé sur le filtre, mais la plus grande partie est restée adhérente aux parois du ballon. Abandonner à l'air, filtre et ballon débouché, pendant au moins 24 heures, de préférence à la glacière pour éviter l'évaporation du liquide d'imprégnation. Dans ces conditions, on voit le précipité se colorer de plus en plus intensément en bleu noir. Sa transformation achevée, le reprendre avec de l'eau distillée, dans laquelle il se dissout alors facilement. Filtrer. Mettre ce nouveau filtrat à évaporer en large cuvette comme le premier. Le résidu de la dessiccation, recueilli par grattage, est de l'azur de méthylène pur.

Une manipulation bien faite doit, en fin de compte, donner des quantités à peu près égales de poudre de violet et de poudre d'azur à l'ammoniaque.

V. — PRÉPARATION D'UN NOUVEAU COLORANT : LE BLEU POLYCHROME A L'AMMONIAQUE.

Le bleu polychrome à l'ammoniaque est un mélange de 2 solutions aqueuses à 1 p. 100, l'une d'azur, l'autre de violet à l'ammoniaque. La proportion optima des deux éléments est, ordinairement, de 1 partie de solution d'azur pour 3 parties de solution de violet. Elle est fixée par tâtonnements, en prenant pour critérium des colorations de crachats muqueux, et de ces mêmes crachats additionnés d'un peu de sang défibriné; le mucus doit être violet rouge, les hématies vertes, les protoplasmes cellulaires bleus, et la sérosité violet bleu (examen à la lumière artificielle).

VI. — NOUVEAUX PROCÉDÉS D'OBTENTION DES ÉOSINATES DE MÉTHYLÈNE.

Les éosinates de méthylène étant insolubles dans l'eau, on les dissout dans de l'alcool absolu, auquel on ajoute une certaine proportion de glycérine pour assurer la stabilité des solutions.

On peut fabriquer ces éosinates en combinant l'éosine soit au bleu de méthylène ordinaire, soit à l'un quelconque des dérivés de ce bleu à la condition que la base ayant servi à sa préparation puisse être éliminée; c'est le cas du bleu Borrel, de l'azur et du violet de méthylène.

Deux méthodes différentes sont à considérer.

1^o PRÉPARATION PAR COMBINAISON DIRECTE DANS L'ALCOOL GLYCÉRINÉ. — On fait deux solutions à 1 p. 100 dans l'alcool glycérimé, l'une d'éosine française (Saint-Denis), l'autre du bleu choisi. On verse, peu à peu, la seconde dans la première en agitant, et en observant le changement de teinte jusqu'à obtention d'un mélange neutre.

On peut contrôler les progrès de la neutralisation de l'éosine par le bleu de la façon suivante. On cesse d'ajouter du bleu; on remue bien le mélange et, à l'aide de l'agitateur de verre, on en prélève une petite goutte qu'on étale en traînée jusqu'à évaporation de l'alcool, laquelle se reconnaît à un

changement brusque de coloration. On fait alors tomber sur une extrémité de la trainée une grosse goutte d'eau distillée neutre; puis on penche la lame de manière que la goutte d'eau glisse sur la trainée et la dépasse. Si elle s'est, dans ce trajet, chargée de rose ou de lie-de-vin, le mélange est encore trop riche en éosine; si elle est restée incolore ou à peine teintée de mauve, le mélange est neutre; si elle est colorée en violet où le bleu prédomine nettement, il y a excès de bleu dans le mélange. En se guidant sur ces indications, on arrive à mettre en présence les doses d'éosine et de bleu nécessaires pour obtenir un mélange neutre.

Le mélange est ensuite abandonné à lui-même pendant plusieurs jours de façon que la combinaison des deux éléments ait tout le temps de s'effectuer.

2° PRÉPARATION PAR PRÉCIPITATION PRÉALABLE. — On fait deux solutions dans l'eau distillée, l'une d'éosine française (Saint-Denis) à 1 p. 1.000, l'autre du bleu choisi à 1 p. 100.

On pratique ensuite une *épreuve de précipitation* dans le genre de celle indiquée à propos de la coloration de Laveran. On se sert de tubes à essai étroits, dans lesquels on distribue d'abord de la solution d'éosine en commençant par 1 goutte et en augmentant d'une goutte par tube. Puis, dans chaque tube, on ajoute 1 goutte de bleu. Bien mélanger; laisser reposer.

Au bout d'un quart d'heure au plus tôt, ou, mieux, après plusieurs heures, examiner les tubes; pour cela, l'opérateur, tourné vers le jour, les inclinera en avant au-dessus d'un fond blanc. La couleur du liquide de surface apparaîtra différente dans la série des tubes : violette dans les premiers, bleue dans les suivants, et enfin rouge lie de vin (excès d'éosine) dans les derniers.

Les proportions les plus avantageuses pour la combinaison sont celles du dernier tube où le liquide de surface est coloré en bleu (dans le tube suivant la coloration tire franchement sur le rouge).

Ces données étant acquises, introduire dans un ballon un volume déterminé de solution d'éosine; ajouter le volume approprié de solution de bleu; mélanger. Chauffer au bain-marie jusqu'à ébullition du bain, pour activer la précipitation. Vider dans un grand verre conique.

Rejeter le liquide qui surnage après quelques heures de repos. Transvaser le fond (liquide et précipité en suspension) dans un ou plusieurs tubes à centrifugation; centrifuger; décanter. Ajouter de l'eau distillée, mélanger, centrifuger, et décanter à nouveau à une ou deux reprises pour laver l'éosinate.

Reprendre l'éosinate, réuni sous forme de culot au fond des tubes à centrifugation, en le dissolvant avec une quantité d'alcool éthylique absolu glycéринé égale à 4 fois le volume de la solution de bleu qui a été employée pour la préparation du précipité.

Laisser reposer pendant plusieurs jours le colorant obtenu, car la solution alcoolique d'éosinate n'acquiert pas immédiatement sa stabilité et son électivité définitives.

VII. — PRÉPARATION ORIGINALE D'UN MÉLANGE D'ÉOSINATES : LE BI-ÉOSINATE.

Le bi-éosinate est un mélange neutre d'éosinate de bleu Borrel et d'éosinate de bleu ordinaire, tous deux en solution

dans l'alcool éthylique absolu glycérimé à 1 p. 10 (alcool, 90; glycérine, 10).

Ces deux solutions d'éosinates sont préparées séparément comme il est dit au chapitre VI, paragraphe 2, l'une avec du bleu Borrel (voir chapitre II), l'autre avec du bleu de méthylène médicinal pur non transformé. Notons en passant que le bleu Borrel demande, pour précipiter, une quantité d'éosine beaucoup moindre que le bleu de méthylène ordinaire.

L'éosinate de bleu Borrel donne, à lui seul, des colorations de sang intéressantes; il colore notamment très bien la chromatine des parasites et les granulations leucocytaires; mais il a le défaut de précipiter très vite une fois mélangé à l'eau, et de donner des bleus protoplasmiques un peu faibles.

Par contre, l'éosinate de bleu ordinaire est un colorant très incomplet, qui n'a pas d'action sur la chromatine des parasites; mais il a l'avantage d'être plus stable que le précédent en présence de l'eau et de donner de beaux bleus.

L'expérience a montré que ces deux éosinates se complètent l'un l'autre.

Les proportions optima de leur association sont fixées par tâtonnements, en comparant entre elles des colorations de sang obtenues avec des mélanges divers. En règle générale, il faut moins de solution d'éosinate de bleu ordinaire que de solution d'éosinate de bleu Borrel (en moyenne 3 parties du premier pour 5 du second).

La teneur globale en colorant de la solution mixte ainsi préparée est quelquefois trop forte; on s'en aperçoit à l'usage, parce qu'elle précipite un peu trop vite après dilution avec la proportion habituelle d'eau distillée; on est ainsi amené à l'étendre d'alcool glycérimé.

VIII. — PRÉPARATION D'UN NOUVEL ÉOSINATE D'AZUR : L'AZÉO.

L'azéo est un éosinate d'azur additionné d'un excès de colorant basique (azur libre), tous deux en solution dans l'alcool éthylique glycérimé à 1 p. 4 (alcool, 75; glycérine, 25).

La solution d'éosinate neutre d'azur est préparée par combinaison directe d'éosine française (Saint-Denis) et d'azur à l'ammoniaque, tous deux en solution à 1 p. 100 dans l'alcool glycérimé à 1 p. 4 (voir chapitre VI, paragraphe 1).

Au bout de quelques jours de maturation, on ajoute à 8 parties de cette solution d'éosinate, 2 parties de la solution d'azur qui a servi à sa fabrication.

IX. — UTILISATION DU BLEU POLYCHROME A L'AMMONIAQUE
ET D'UNE SOLUTION AQUEUSE D'AZUR À L'AMMONIAQUE.

1°. Le bleu polychrome à l'ammoniaque est un colorant vigoureux, stable, jouissant d'une métachromasie très accentuée. Je le trouve préférable à la thionine phéniquée et au bleu de Unna, et je l'ai substitué à ces colorants dans ma pratique journalière.

Il est parfait pour les nombreux examens rapides, dits par coloration simple, pratiqués dans les laboratoires, tels que : contrôle bactériologique des cultures, analyses cyto-bactériologiques des produits pathologiques divers (crachats, pus, écoulements uréthraux, enduits d'ulcérations, sang étalé en trainée épaisse et déshémoglobinisé par l'alcool au tiers pour la recherche des corps en croissant du paludisme, etc...) et des culots de liquides centrifugés (liquides céphalo-rachidiens, pleuraux, ascitiques, sang paludéen hémolysé dans l'alcool au tiers, etc...).

Mode d'emploi. — Étaler les produits sur lames par les procédés ordinaires ; sécher ; fixer à l'alcool absolu. Colorer 30 secondes à 1 minute ; laver, sécher. Différencier à l'alcool si la teinte est trop foncée. Examiner à l'immersion et à la lumière artificielle.

RÉSULTATS. — Hématies vertes. Noyaux normaux violets ; noyaux altérés rouges. Protoplasmes bleus. Mucus rouge. Microbes bleus ou violets, et très finement colorés.

2°. L'azur à l'ammoniaque peut être utilisé, sous forme de solution aqueuse à 1 p. 100, pour la coloration de produits organiques frais et à l'état liquide (sérosités, mucosités dysentériques, etc...). Il suffit de mélanger une goutte de colorant à une goutte de liquide, de recouvrir d'une lamelle, de luter et d'examiner à l'immersion avec éclairage artificiel. J'ai obtenu ainsi des colorations intéressantes de cellules, d'amibes, etc... La coloration est d'abord progressive, puis régressive ; elle est parfois génée par la réaction chimique des produits.

X. — MÉTHODE ORIGINALE DE COLORATION AU BI-ÉOSINATE.

Elle est surtout applicable aux préparations de sang, et tout particulièrement de sang parasité (paludisme, typhus récurrent, trypanosomiase, etc...).

Elle donne aussi de bonnes colorations des spirochètes [suc chancreux, pulpe hépatique (1), etc...] et des cellules des liquides pathologiques (pus, culots de sérosités centrifugées, etc...), mais à la condition que les étalements soient bien minces.

Elle doit être effectuée *sur lames* parce que le bi-éosinate ne se prête pas aux colorations collectives en bains. En effet, dilué de façon à ne précipiter qu'à la longue, un bain de bi-éosinate n'a plus une puissance colorante assez grande, et, si on essaie de le renforcer en ajoutant du colorant, il précipite trop vite.

La méthode de coloration est facile, rapide, et ses résultats sont excellents, si l'eau utilisée est absolument pure et neutre, et si on se conforme, d'une part, au mode d'emploi suivant.

Mode d'emploi du colorant. — Étaler le sang en couche mince (de préférence par le procédé de la carte de visite, ou le procédé des ciseaux). Sécher par agitation à l'air; ne faire agir aucun fixateur.

Délimiter le frottis par un trait tracé avec un crayon à verre ou avec un morceau de paraffine. Puis, à l'aide d'une pipette réservée à cet usage, faire tomber sur le frottis 0 c.c. 2 de bi-éosinate pur (soit 12 gouttes environ); étaler le colorant sur la nappe de sang; abriter aussitôt sous couvercle de boîte de Petri.

Au bout de 3 minutes, pendant lesquelles le bi-éosinate pur a fixé le sang et amorcé la coloration, saisir la lame et l'incliner légèrement de façon à rassembler le liquide le long d'un grand bord.

Faire tomber, goutte à goutte, dans le bi-éosinate 0 c.c. 6 d'eau distillée (soit 12 gouttes environ), chauffée vers 40° en

(1) Les frottis de foie doivent être extrêmement minces; une fois secs, on les dégraisse à fond à l'éther, puis on les colore comme des frottis de sang.

hiver. Mélanger sans tarder par quelques mouvements de roulis. Déposer la lame à plat; ne plus la remuer.

Au bout de 12 minutes environ (25 minutes quand il s'agit d'objets très difficiles à colorer, tels que les spirochètes de la syphilis) entraîner brusquement la solution colorante et son voile de surface avec de l'eau distillée versée en jet sur le talon de la lame. Sécher vite au papier filtre puis en s'aidant modérément d'une flamme.

RÉSULTATS. — Colorations fouillées, nuancées, électives. Les globules rouges sont jaunes brun pâle, les noyaux violets ou lie de vin, les protoplasmes bleus; toutes les granulations leucocytaires sont mises en évidence. Les parasites sont teintés en bleu, leur chromatine et leurs flagelles en rouge.

XI. — NOUVEAU PROCÉDÉ DE COLORATION PANOPTIQUE AU BI-ÉOSINATE ET A L'AZÉO.

C'est l'application au bi-éosinate et à l'azéo de la méthode panoptique réalisée par Pappenheim avec le May-Grünwald et le Giemsa.

Les applications et les résultats en sont les mêmes que pour le bi-éosinate seul. Son unique inconvénient, qui est de nécessiter l'emploi de deux colorants, est largement compensé par deux importants avantages. D'abord, ce procédé rend possible la coloration simultanée de plusieurs lames *en bains*; car on peut faire des dilutions d'azéo fort actives et qui, cependant, précipitent très lentement (au bout de 30 à 45 minutes).

Ensuite, les bains d'azéo colorent convenablement des préparations de sang trop épaisses, et des frottis de pus, de matières fécales, etc., dont on tire difficilement parti avec le bi-éosinate.

Technique de la coloration. — Étaler le sang en couche mince; sécher par agitation à l'air; ne pas fixer.

Avec une pipette réservée à cet usage, faire tomber sur le frottis une dizaine de gouttes de bi-éosinate; étaler, abriter aussitôt sous couvercle de boîte de Petri.

Au bout de 3 minutes, pendant lesquelles le bi-éosinate pur a fixé le sang et amorcé la coloration, laver à l'eau distillée.

Faire alors, extemporanément, un bain d'azéo à 1 p. 50 dans

l'eau distillée. En prenant pour exemple le cas où l'on a deux préparations à colorer, mesurer 25 cent. cubes d'eau distillée; les verser dans une boîte de Petri à fond bien plan; faire tomber dans cette eau, avec une pipette réservée à cet usage, 0 c.c. 5 d'azéo (si on préfère compter par gouttes, cela fait sensiblement 1 goutte d'azéo par centimètre cube d'eau); mélanger. Plonger aussitôt dans ce bain les lames encore humides, face enduite en-dessus; ne plus agiter.

Au bout de 12 minutes environ, retirer les préparations; laver rapidement à l'eau distillée. Sécher vite.

N. B. — S'il fallait éclaircir les préparations ou enlever un précipité, plonger les lames une fraction de seconde dans l'alcool à 80° glycériné à 1 p. 10; relaver et sécher très vite. S'il fallait renforcer, replacer les lames dans le bain colorant (utilisable pendant plus d'une demi-heure), sans se préoccuper de la gouttelette d'huile de cèdre mise pour un examen rapide (un lavage au xylol nuirait au renforcement).

— Si on préférerait réaliser la méthode panoptique par coloration sur lame, au lieu de la coloration en bain, on remplacerait l'azéo par une solution alcoolo-glycérinée d'éosinate d'azur neutre (voir chapitre VIII) diluée à 1 p. 20 dans l'eau distillée et versée sur la lame (12 minutes de contact). C'est une bonne façon d'utiliser cette solution colorante.

XII. — UTILISATION DE L'AZÉO SEUL.

L'azéo, seul, donne des préparations moins belles que celles où la coloration a été amorcée par le bi-éosinate : les globules rouges ont une teinte verte, et le plasma répandu entre eux est souvent coloré en bleu. Néanmoins, elles sont très suffisantes pour un diagnostic cyto-parasitologique.

La technique est identique à la précédente, sauf qu'on fixe pendant 5 minutes à l'alcool absolu; après quoi on sèche au papier filtre et on plonge dans le bain d'azéo.

XIII. — PROCÉDÉ SIMPLIFIÉ POUR LA COLORATION DES GRANULATIONS POLAIRES DU BACILLE DIPHTÉRIQUE.

Tout en étant d'une exécution facile et rapide, ce procédé a l'avantage d'utiliser un colorant couramment employé pour la

coloration de Gram : le cristal violet phéniqué, que je conseille de fabriquer comme suit.

PRÉPARATION DU CRISTAL VIOLET PHÉNIQUÉ. — Broyer 1 gramme de cristal violet de fabrication française dans un mortier; ajouter 2 gr. 50 d'acide phénique neigeux; triturer; laisser liquéfier pendant quelques minutes. Mesurer 10 cent. cubes d'alcool éthylique absolu; en verser une partie dans le mortier et triturer de nouveau pour achever de dissoudre le colorant et l'acide phénique. Transvaser la solution obtenue dans un flacon. Se servir du reste de l'alcool, puis de 90 cent. cubes d'eau distillée (par fractions) pour bien rincer le mortier; recueillir le liquide de rinçage dans le flacon; agiter le tout. Avoir soin de ne filtrer sur papier qu'au moment de remplir les flacons compte-gouttes en service.

Technique de la coloration. — Émulsionner une parcelle de colonie du bacille diphthérique dans une gouttelette d'eau, sur lame porte-objets; étaler, laisser sécher, fixer à l'alcool absolu.

Colorer pendant environ 5 minutes au cristal violet phéniqué. Laver à l'eau ordinaire.

Faire agir une solution de vésuvine à 1 p. 500 jusqu'à ce que la coloration du frottis passe du violet au brun (1 à 2 minutes suivant son épaisseur). Laver à l'eau ordinaire. Sécher.

RÉSULTATS. — Les granulations polaires, d'un beau violet noir, tranchent vigoureusement sur le corps jaunâtre des bacilles.

XIV. — PROCÉDÉ DE NITRATATION DES SPIROCHÈTES MODIFIÉ.

J'ai complété et réglé le procédé de nitration de Fontana, de façon à lui permettre d'être appliqué à tous les cas, notamment au diagnostic si important des ulcérations syphilitiques. Le procédé ainsi modifié est connu sous le nom de procédé Fontana-Tribondeau. Il se recommande par la simplicité et la rapidité de son exécution (moins de 5 minutes). Il expose moins à des erreurs que le procédé négatif à l'encre de Chine, de Burri. Il n'a pas la lenteur du procédé à la largine de P. Ravaut, et n'utilise que des produits qu'on peut se procurer facilement. Il permet un diagnostic à distance par l'envoi de frottis sur lames, et ne nécessite aucun outillage spécial, ni aucun déplacement des malades, ce en quoi il est supérieur à l'examen ultramicroscopique.

Recherche des spirochètes de la syphilis. — La nitration rend des services inestimables en facilitant le diagnostic bacté-

riologique précoce de la syphilis et, par suite, en légitimant l'application immédiate d'un traitement intensif seul capable d'enrayer les manifestations secondaires (contagieuses) et tardives (graves) de la maladie. Mais il ne faut pas oublier que, le plus souvent, les spirochètes de la syphilis ne peuvent plus être décelés dans un chancre qui a été traité activement, en particulier avec l'iodoforme, l'aristol ou le calomel, dont la vogue est malheureusement trop grande.

Aussi devrait-on poser en règle absolue : 1° que *tout chancre, cliniquement dur ou mou, doit être l'objet d'une recherche du spirochète de la syphilis*; 2° que *jusqu'au moment où le prélèvement du suc chancreux en vue de cette recherche aura été effectué, le traitement local doit se borner à des lavages à l'eau bouillie et à des applications de poudres absorbantes inertes (amidon, talc)*.

Quand cette règle a été enfreinte et qu'un malade se présente au bactériologiste, ayant subi un traitement local antiseptique, on est le plus souvent obligé de remettre la recherche à plus tard et d'ordonner dans l'intervalle des pansements à l'eau bouillie.

Voici comment il faut procéder pour recueillir le suc chancreux. Tout d'abord, s'il existe plusieurs ulcérations, on s'adressera en premier lieu à celle qui, cliniquement, est la plus suspecte. On prélèvera, non pas l'enduit putrilagineux qui recouvre le chancre, mais le suc contenu dans l'épaisseur même de ses parois, et de préférence, dans les parties les plus indurées. Donc, bien déterger le chancre avec des tampons humides, puis l'assécher. Pratiquer à l'endroit choisi, sur les confins de l'ulcération, en pleine zone envahissante de la lésion, quelques petites scarifications rayonnantes, à cheval sur le chancre et sur sa bordure épidermique, parallèles entre elles, courtes (2 ou 3 millimètres environ), et assez profondes pour faire sourdre du sang.

Pincer, quand c'est possible, le chancre entre deux doigts, et recueillir par raclage, avec l'instrument ayant servi aux scarifications, la sérosité sanglante qui suinte. L'étaler sur lames en couche mince. Si, au début, du sang pur s'écoule en abondance, arrêter l'hémorragie par une légère compression, et ne faire le prélèvement qu'ensuite.

Sécher les frottis par agitation à l'air; *surtout ne pas chauffer et ne pas fixer*, car on ne pourrait plus, ultérieurement, se débarrasser de l'hémoglobine.

— A la période secondaire de la syphilis, la recherche du spirochète de la syphilis dans les ulcérations buccales suspectes peut fixer un diagnostic hésitant. Elle sera pratiquée aussi sur le suc extrait par scarification.

— Enfin j'ai décelé par nitratisation les spirochètes de la pulpe du foie du fœtus hérédosyphilitique, ce qui a son intérêt quand on veut être sûr de la spécificité d'un foie utilisé pour la lipo-déviations du complément (ou réaction de Wassermann). D'autre part, c'est par la nitratisation que Levaditi a reconnu la présence de spirochètes dans l'écorce cérébrale de paralytiques généraux, démontrant ainsi la nature syphilitique de leur affection. Dans les deux cas, un peu de pulpe de l'organe est écrasée sur lame en couche aussi mince que possible.

Recherche des autres spirochètes. — Les spirochètes de toute espèce sont colorables par nitratisation. J'ai obtenu de très belles préparations avec du sang de typhique récurrent en accès fébrile, avec le pus de la balanite érosive, avec la salive, avec le putrilage de l'angine de Vincent, avec des selles de dysenterie du type Le Dantec...

Les spirochètes de l'ictère hémorragique méritent enfin une mention spéciale, en raison de l'actualité de la maladie qu'ils provoquent. La nitratisation les met également bien en évidence dans la pulpe hépatique des cobayes inoculés étalée en couche très mince, et dans le culot des urines humaines préparées de la façon suivante, préconisée par M. Fiessinger: centrifuger 10 cent. cubes d'urines récemment émises dans un appareil électrique à rotation intensive, pendant 10 minutes. Décanter. Homogénéiser le culot par aspirations et rejets successifs à la pipette très fine. En dernier lieu, l'aspirer et en déposer des gouttelettes très petites, à peine étalées, à la surface de lames de verre porte-objets bien nettoyées à l'alcool et sèches. Laisser évaporer, de préférence, à l'étuve à 37°.

Préparation des réactifs. — 3 solutions sont nécessaires :*1° Solution de formol acétique (liquide de Ruge) :*

Acide acétique pur.	1 cent. cube.
Formol à 40 p. 100, dit du commerce . . .	2 cent. cubes.
Eau distillée.	100 cent. cubes.

2° Mordant au tanin :

Tanin à l'alcool ou à l'éther	1 gramme.
Eau distillée.	20 cent. cubes.

Dissoudre le tanin dans l'eau très chaude. Conserver en flacon bien bouché et additionné d'un morceau de camphre pour éviter le développement des moisissures.

3° Solution de nitrate d'argent ammoniacal (liquide de Fontana) :

Nitrate d'argent	1 gramme.
Eau distillée.	20 cent. cubes.

Dissoudre à froid. Verser une certaine quantité de cette solution dans un verre à pied très propre. Ajouter peu à peu de l'ammoniaque avec une pipette, en agitant constamment avec une baguette de verre ; il se forme un précipité brunâtre qui fonce progressivement, puis se décolore assez brusquement. A partir du moment où la décoloration commence, on ne versera plus l'ammoniaque que très prudemment, et on s'arrêtera quand la solution est encore légèrement opalescente ; si elle devient eau de roche, ajouter lentement un peu de solution de nitrate d'argent jusqu'à production de la faible opalescence désirée.

Mode d'emploi des réactifs. — Arroser la préparation de solution de formol acétique qu'on renouvelle plusieurs fois, et qu'on laisse agir en tout de 1 à 5 minutes. Insister pour que le frottis soit complètement déshémoglobinisé, car l'hémoglobine accapare le nitrate d'argent, masque les spirochètes et gêne leur coloration. Égoutter.

Quand on a à nitrater du suc d'ulcérations, ce qui est le cas le plus fréquent, il suffit de laver à l'alcool absolu (ou à 80°-95°). Sécher au papier filtre ; ou bien mettre le feu à ce qui reste d'alcool sur la lame et, presque aussitôt, souffler fortement sur elle, de son talon vers son extrémité (de cette façon, et d'un même coup, la flamme est éteinte, le frottis asséché, et une fixation par chauffage modéré réalisée).

Quand il s'agit de frottis d'organes (foie, cerveau, ...), il faut chasser les graisses qui gêneraient l'imprégnation par un triple lavage : à l'alcool, puis à l'éther, et enfin de nouveau à l'alcool.

Recouvrir ensuite abondamment de mordant au tanin; puis promener la préparation sur la veilleuse d'un Bunsen, ou sur toute source de chaleur équivalente, jusqu'à dégagement abondant de vapeur, mais sans faire bouillir, et en évitant que le liquide laisse des parties du frottis à découvert. Retirer alors la préparation de la flamme, et ne rejeter le mordant que 30 secondes après.

Bien laver à l'eau ordinaire, sous robinet (30 secondes environ); rincer ensuite à l'eau distillée; égoutter, inutile de sécher.

Recouvrir le liquide de Fontana, qu'on laisse agir à froid pendant quelques instants jusqu'à ce que la nitratisation soit bien amorcée. Rejeter ce liquide, le renouveler, et chauffer comme il a été dit pour le tanin. Retirer ensuite de la flamme et laisser refroidir (15 secondes environ). La préparation doit avoir à ce moment une teinte marron à reflets métalliques.

Laver à l'eau distillée (éviter l'eau ordinaire qui affaiblit la teinte); quelques secondes suffisent. Sécher au papier filtre puis en s'aidant modérément d'une flamme.

RÉSULTATS. — Les spirochètes sont colorés en brun jaunâtre ou noirâtre et d'une netteté parfaite.

Se méfier de l'huile de cèdre, qui décolore les préparations; l'enlever au xylol aussitôt l'examen microscopique achevé. Si on voulait étudier longuement une préparation ou la revoir fréquemment, monter dans la glycérine neutre et luter la lamelle.

XV. — MÉTHODE ORIGINALE DE COLORATION DES CILS MICROBIENS.

La présence de cils, leur répartition sur le corps microbien, leur nombre sont autant de caractères morphologiques utilisables pour l'identification de germes pathogènes tels que : le vibron cholérique, le bacille pyocyanique, les bacilles typhiques et paratyphiques, le *Proteus*, etc... Aussi ne s'explique-t-on pas que la recherche des cils soit si peu utilisée pour le diagnostic rapide des microbes, si les procédés de coloration classiques pour les mettre en évidence n'étaient, la plupart, d'une exécution délicate et infidèles dans leurs résultats.

A condition de se conformer très exactement aux indications fournies, la méthode que je vais décrire donne de bonnes pré-

parations. Elle a l'avantage de ne nécessiter aucune manipulation longue et difficile.

Étalements microbiens. — Les cultures en milieux liquides ne conviennent pas. Par contre, presque tous les milieux solides habituels donnent des colonies utilisables pour la recherche, par exemple : gélose ou bouillon ordinaire, gélose lactosée tournesolée, gélose de Dieudonné, etc... Mais le milieu de choix est la solution de panse Martin (sans viande), gélosée à 2 p. 100, et de réaction légèrement alcaline.

Prélever, de préférence vers la 15^e heure d'incubation à 37°, une parcelle de colonie avec une pipette Pasteur à effilure boutonnée. L'émulsionner doucement dans de l'eau distillée jusqu'à obtention d'un louche peu accentué et homogène.

Choisir des lames porte-objets neuves (à défaut, faire bouillir les lames usagées dans une solution aqueuse de bichromate de potasse à 50 p. 1.000 additionnée de 100 cent. cubes d'acide sulfurique; puis les laver abondamment). Nettoyer les lames à l'alcool; les sécher avec un linge fin très propre.

Déposer sur la lame, près d'une extrémité, une très grosse goutte d'émulsion microbienne. Incliner la lame jusqu'à la verticale de manière que la goutte glisse vers l'extrémité la plus éloignée, en abandonnant derrière elle une large trainée humide. La lame étant maintenue verticale, réaspirer à la pipette, immédiatement et le plus complètement possible, l'excès d'émulsion collecté à son extrémité inférieure. Laisser sécher, toujours dans la même position.

Au lieu du procédé précédent, qui mériterait le nom de « procédé de la trainée », on peut employer celui des « gouttes réaspirées » consistant à déposer sur la lame de verre placée horizontalement plusieurs gouttes d'émulsion séparées, et à réaspirer rapidement au centre de chacune la plus grande quantité possible de liquide avec une pipette très effilée.

Au moment de les colorer, les préparations microbiennes sont fixées en les arrosant d'alcool absolu dont on enflamme les dernières gouttes; presque aussitôt, on souffle fortement sur la lame, de son talon vers son extrémité, ce qui, du même coup, éteint la flamme, assèche le frottis et évite un chauffage exagéré. Laisser refroidir avant de colorer.

Préparation des réactifs. — Deux réactifs sont nécessaires : une solution mordançante à l'alun-tanin et une solution colorante au cristal violet. Leur préparation demande un peu d'attention, car *c'est d'elle surtout que dépend la réussite des colorations.*

1° *Mordant à l'alun-tanin.* — Faire une solution saturée d'alun, à raison de 12 grammes d'alun de potasse pulvérisé au mortier, pour 100 cent. cubes d'eau distillée chaude; laisser reposer tranquillement, au frais, pendant une bonne journée, de façon que l'excès d'alun ait le temps de cristalliser; décanter et filtrer.

Préparer, d'autre part, une solution, de tanin, à raison de 10 grammes de tanin à l'éther (ou à défaut à l'alcool) pour 100 cent. cubes d'eau distillée chaude.

Mélanger les deux solutions précédentes dans la proportion de 2 volumes de solution d'alun pour 1 volume de solution de tanin. Chauffer le mélange à 120°, dans l'autoclave, pendant une demi-heure (important, car sans cette précaution, certains tanins sont inutilisables). Filtrer chaud, sur papier filtre, au sortir de l'autoclave; refiltrer après refroidissement s'il existe un trouble. Le liquide brun obtenu constitue le mordant.

2° *Colorant au cristal violet.* — Faire une solution alcoolique mère de cristal violet à $\frac{1}{20}$. Pour cela, pulvériser le cristal violet au mortier, verser dans un flacon, ajouter 20 cent. cubes d'alcool éthylique absolu par gramme de poudre.

Se servir de cette solution mère pour préparer, en petite quantité, 3 solutions plus étendues, à $\frac{1}{200}$, $\frac{1}{100}$ et $\frac{1}{50}$, qui permettront de trouver le titre de la solution optima à employer pour les colorations. Par exemple :

Sol. mère, 1 vol. + alc. éthylique abs..	9 vol. = colorant à 1 p. 200
— 2 vol. + —	8 vol. = — à 1 p. 100
— 4 vol. + —	6 vol. = — à 1 p. 50

Rechercher, par tâtonnements, quelle est, de ces 3 solutions colorantes, celle qui convient le mieux.

Pour cela, verser dans une casserole métallique de ménage d'enfant, ou dans une petite capsule de porcelaine, 5 cent. cubes de mordant, puis 0 c. c. 5 de l'une des solutions colorantes précédentes (mesurer avec deux pipettes graduées appropriées). Un tour pour mélanger. Chauffer au bec Bunsen ou à toute autre grosse flamme équivalente. Aussitôt l'ébullition obtenue, sortir de la flamme, donner un tour et verser sur la lame portant les microbes, de façon à recouvrir abondamment, d'un seul coup, la surface à colorer. Laisser agir une vingtaine de secondes, trente au plus. Puis, laver à l'eau ordinaire, versée brusquement sur le talon de la lame, de façon à entraîner le colorant avec sa pellicule de surface, qui pourrait adhérer à la préparation si on rejetait le colorant avant de laver. Égoutter, sécher au papier filtre, puis en s'aidant d'une flamme.

Procéder de la même façon pour les 2 autres solutions colorantes, en ayant soin, après chaque essai, d'enlever la couche de violet adhérente aux parois de la casserole ou de la capsule en y faisant bouillir un peu de mordant à l'alun-tanin, de la rincer à l'eau ordinaire, et de l'essuyer.

Comparer entre eux les résultats obtenus : 1° au point de vue de la rapidité de l'apparition du précipité; 2° au point de vue de l'imprégnation des cils.

1^o Une observation attentive du colorant au cours même de son emploi permet de reconnaître la solution la plus favorable à ce qu'elle commence à précipiter dès qu'elle a été versée sur la lame ou dans les 5 secondes qui suivent. Un colorant qui contient déjà un précipité bien apparent au moment où on le verse sur la lame, est trop riche en cristal violet; un colorant qui tarde à précipiter une fois versé est trop pauvre en cristal violet; dans les deux cas il n'est pas bon.

2^o Un examen microscopique des préparations vient ensuite compléter l'observation précédente, en montrant quelle est celle qui présente à la fois les cils le mieux colorés et le fond le moins encombré de précipités.

— Cette épreuve terminée, on sait à quel titre il faut ramener la solution alcoolique mère pour la transformer en *solution colorante optima*. Il est exceptionnel d'avoir à essayer des solutions plus étendues que 1 p. 200 ou plus concentrées que 1 p. 50 pour acquérir cette notion.

— D'ordinaire, c'est la solution alcoolique de cristal violet à 1 p. 100 qui remplit les conditions requises.

— Le résultat du titrage est valable ultérieurement pour de nouvelles solutions, à condition de se servir toujours du même lot de produits : alun, cristal violet et surtout tanin.

Mode d'emploi des réactifs. — La technique de coloration des préparations ne diffère en rien de celle qui a été indiquée pour éprouver les solutions de cristal-violet. Donc : additionner 5 cent. cubes de mordant de 0 c.c. 5 de solution optima de cristal-violet; porter le mélange à l'ébullition; verser bouillant sur les microbes; laisser agir environ 20 secondes; laver; sécher.

Nettoyer le récipient en y faisant bouillir du mordant et en le rinçant à l'eau ordinaire, après chaque coloration.

RÉSULTATS. — Les microbes sont colorés en violet foncé, les cils en violet un peu plus pâle. Tous les cils, à quelque espèce microbienne qu'ils appartiennent, sont colorables par cette méthode.

Il y a toujours un certain précipité violet sur le fond de la préparation, mais en de nombreux endroits il fait défaut ou ne gêne pas.

— On peut obtenir des cils aussi intensément colorés que les microbes en utilisant un mordant formé de solution d'alun et de tanin à parties égales, ce qui entraîne l'emploi d'une solution colorante optima plus riche en cristal-violet (à 1 p. 50 généralement), mais le fond est souvent encombré de précipités.

— Une préparation où les cils sont trop pâles, le fond étant resté propre, peut être renforcée par virage au brun noir dans

de l'eau distillée additionnée d'une petite quantité de liquide de Fontana; laver ensuite à l'eau *distillée*; sécher.

— Inversement, une préparation à fond surchargé, mais où les cils sont fortement colorés, peut être corrigée par affaiblissement en versant sur la lame de la solution tannique dédoublée (donc à 5 p. 100). On chauffe doucement en promenant la préparation pendant quelques secondes au-dessus d'une petite flamme; on lave brusquement dès que la teinte violette a un peu pâli, et on sèche.

— Il arrive que, quelque soin qu'on apporte dans l'exécution de la méthode, les cils microbiens de certaines cultures ne se colorent pas. Ces insuccès sont imputables aux microbes eux-mêmes, qui, dans ces colonies, sécrètent autour d'eux des substances qui empêchent la coloration. Le mieux est alors de réensemencer les germes à colorer et de faire plusieurs préparations avec des colonies d'âges différents entre six heures et vingt-quatre heures.

XVI. — PRÉPARATION D'UNE NOUVELLE HÉMATÉINE :

L'HÉMATÉINE A L'ARGENT.

L'hématéine alunée ou hémalun est le colorant nucléaire le plus répandu et le plus commode pour les préparations histologiques et histo-pathologiques.

Or les solutions d'hémalun en usage ont l'inconvénient de n'acquérir leurs propriétés électives qu'au bout d'un certain temps de maturation, puis de les perdre parce qu'elles continuent à se transformer. Pour assurer la conservation du colorant, Grüber fabrique un hémalaun sec; mais ce produit n'est pas très puissant, et il s'altère assez vite une fois en solution.

L'hématéine à l'argent que j'ai obtenue par action de l'oxyde d'argent sur l'hématoxyline possède la propriété de se conserver indéfiniment, et de donner par addition d'eau alunée un colorant immédiatement utilisable et très stable.

1^o PRÉPARATION DE L'OXYDE D'ARGENT. — Ne diffère en rien de celle indiquée pour le bleu Borrel. (Voir chapitre II, 1^o.)

2^o TRANSFORMATION DE L'HÉMATOXYLINE. — Dissoudre 2 gr. 50 d'hématoxyline de fabrication française dans 50 cent. cubes d'alcool éthylique absolu.

Vider cette solution sur le précipité d'oxyde d'argent fourni par 1 gramme de nitrate d'argent, dans un ballon à long col. Chauffer au bain-marie en

agitant de temps à autre le récipient, et jusqu'à ébullition de la solution alcoolique. Celle-ci a alors acquis une coloration orange foncée, indice de la transformation de l'hématoxyline en hémateïne à l'argent. Filtrer sur papier. Garder en flacon bien bouché.

XVII. — COLORATION A L'HÉMALUN-ÉOSINE MODIFIÉE.

Elle fournit de très bons résultats pour les coupes histologiques courantes, et pour l'étude cytologique de divers liquides organiques, principalement en vue de la recherche des cellules éosinophiles (sang, crachats, culots de centrifugation de liquides organiques pathologiques, pus, etc...).

Coupes. — Les pièces, incluses à la paraffine, sont débitées en coupes minces, étalées sur l'eau tiède, déposées sur lames, et séchées à l'étuve. Enlever la paraffine par action successive du xylol, de l'alcool, et de l'eau.

Frottis. — Sang, crachats, culots, pus, etc... sont étalés sur lames par les moyens habituels. Sécher à l'étuve. Fixer à l'alcool; sécher.

Préparation des réactifs :

1° *Hémalun à l'argent.* — Suivant la consommation qu'on doit en faire, préparer une certaine quantité d'hémalun à l'argent en versant dans une partie d'hémateïne à l'argent (solution alcoolique) 20 parties d'eau alunée :

Alun de potasse	50 grammes.
Eau distillée	1.000 cent. cubes.
Le mélange vire aussitôt au violet.	

2° *Solution d'éosine.*

Éosine à l'eau dite française (Saint-Denis)	0 gr. 50
Alcool absolu	50 cent. cubes.
Eau distillée	50 cent. cubes.

Mode d'emploi des réactifs. — Recouvrir la coupe ou le frottis d'hémalun à l'argent filtré. Au bout de deux minutes environ, laver à l'eau ordinaire.

Recouvrir en second lieu de solution d'éosine. Au bout d'une à deux minutes pour les coupes, de 15 à 20 secondes seulement pour les frottis, laver à l'eau ordinaire.

Pour les coupes, terminer par montage au baume sous

lamelle (alcool absolu, xylol, baume du Canada au xylol). Pour les frottis, sécher au papier filtre puis en s'aidant modérément d'une flamme.

RÉSULTATS. — Les noyaux sont colorés très électivement en violet; les protoplasmes et formations tissulaires sont roses; les granulations éosinophiles se distinguent très nettement.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

- TRIBONDEAU. — Diagnostic microscopique du chancre induré. *Gazette hebdomadaire des Sciences médicales de Bordeaux*, 13 octobre 1912.
- Coloration des tréponèmes du chancre syphilitique. Son importance au point de vue du diagnostic et du traitement précoce de l'avarie. *Archives de médecine et de pharmacie navales*, février 1913.
- Recherche du tréponème de Schaudinn dans les ulcérations, par le procédé Fontana-Tribondeau. *Journal des Praticiens*, 20 juin 1914.
- TRIBONDEAU, FICHET et DUBREUIL. — Procédé de coloration des liquides organiques et de leurs parasites. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1^{er} avril 1916.
- Nouvelle technique de coloration des coupes par l'hémalun-éosine. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 1^{er} avril 1916.
- Méthode de coloration des cils microbiens. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 22 juillet 1916.
- TRIBONDEAU. — Étalement du sang sur lames de verre porte-objets par le « procédé des ciseaux ». *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 18 novembre 1916.
- Sur le mode d'emploi du bi-éosinate. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 2 décembre 1916.
- TRIBONDEAU et DUBREUIL. — Nouveaux colorants pour microscopie dérivés du bleu de méthylène. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 2 avril 1917.
- TRIBONDEAU. — L'eau distillée pour colorations microscopiques. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 31 mars 1917.
- TRIBONDEAU et DUBREUIL. — Procédé de coloration des granulations polaires du bacille diphtérique. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 31 mars 1917.
- Deux procédés pour la recherche rapide des croissants dans le sang des malades suspects de paludisme. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 19 mai 1917.
- Coloration et nitration des spirochètes ictériques dans les frottis de foie de cobaye. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 19 mai 1917.

Le Gérant : G. MASSON.

